



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

HORLANDO CARLOTA DA SILVA

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE *Bauhinia pentandra*
(BONG.) D.DIETR.

FORTALEZA

2020

HORLANDO CARLOTA DA SILVA

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE *Bauhinia pentandra*
(BONG.) D.DIETR.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Química. Área de Concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Profª. Dra. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S58i Silva, Horlando Carlota da.

Investigação química e avaliação biológica de *Bauhinia pentandra* (Bong.) D.
Dietr. / Horlando Carlota da Silva. – 2020.
143 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2020.

Orientação: Profª. Dra. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago.

1. Bauhinia Pentandra. 2. Flavonoides. 3. Derivados Oxepínicos. 4. Acetilcolinesterase. 5. Atividade antibacteriana. I. Título.

CDD 540

HORLANDO CARLOTA DA SILVA

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE *Bauhinia pentandra*
(BONG.) D.DIETR.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Química. Área de Concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: 31/01/2020.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Jane Eire Silva Alencar de Menezes
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva da vida e iluminação concedida para realizar os nossos propósitos.

À minha família, em especial aos meus pais, Luciano Alves e Maria Rita pelo incentivo e apoio para que eu prosseguisse nos estudos.

Em especial à professora Gilvandete, pelo apoio, carinho, paciência e ensinamentos repassados.

Aos colegas de laboratório, Roberto, Leôncio, Jarbas, Nicaely, Ítalo, Dilailson, Luís, Aurélio e Ana Maria, pelos conselhos e ajuda. Em especial ao Erivaldo que esteve mais presente, ajudando com sugestões para aprimorar a escrita desse trabalho. Agradeço também a professora Angela Martha por seu carinho e acolhimento.

A todos os professores da pós-graduação pelos ensinamentos, incentivos e apoio durante a minha formação.

Ao laboratório LAFIPLAM II pela receptividade durante as análises no CLAE em nome da professora Ótilia e em especial ao Francisco das Chagas pelas instruções durante os experimentos.

Agradeço também a professora Tereza e ao Anderson pela realização do teste da acetilcolinesterase e ao professor Hélcio pelo teste antibacteriano.

Ao CENAUREMN e aos operadores pela colaboração e auxílio nos experimentos.

A CAPES, CNPq e FUNCAP pelo apoio financeiro.

A todos que não citei, mas que de alguma forma contribuíram nessa trajetória, o meu muito obrigado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A utilização de plantas medicinais como recurso terapêutico é um conhecimento popular que desempenha importante papel na prevenção e cura de doenças. Pesquisas revelaram que constituintes químicos de plantas do gênero *Bauhinia* exibem diversas atividades biológicas, tais como inibitória da acetilcolinesterase, antibacteriana, modificadora de antibióticos, citotóxica, dentre outras. No entanto, ainda existem muitas espécies desse gênero que precisam ser estudadas com relação ao perfil fitoquímico. Desta forma, o presente trabalho relata a investigação química e biológica do extrato etanólico do caule de *B. pentandra* (**EECBP**), que resultou no isolamento e determinação estrutural de onze metabólitos secundários: a mistura dos esteroides sitosterol e estigmasterol (**BPC-1a** e **BPC-1b**), dois derivados oxepínicos bauhiniastatina 1 (**BPC-2**) e bauhiniastatina 4 (**BPC-3**), sete flavonoides 7,4'-diidroxiflavana (**BPC-4**), (2*S*)-liquiritigenina (**BPC-5**), (2*S*)-naringenina (**BPC-6**), isoliquiritigenina (**BPC-7**), poriol (**BPC-8**), (-)-fisetinidol (**BPC-9**) e fisetina (**BPC-10**). Ressalta-se que **BPC-8** está sendo descrito pela primeira vez no gênero *Bauhinia* e com exceção da mistura de esteroides, os demais compostos estão sendo relatados pela primeira vez na espécie *B. pentandra*. As estruturas das substâncias foram caracterizadas através de técnicas espectroscópicas, tais como IV, RMN de ¹H e ¹³C e por tempos de retenção de amostras padrão em CLAE, além da comparação com dados descritos na literatura. O extrato etanólico (**EEBPC**), bem como os compostos isolados **BPC-2**, **BPC-3**, **BPC-4**, **BPC-5**, **BPC-6**, **BPC-7** e **BPC-10** foram avaliados como inibidores da acetilcolinesterase usando o método de Ellman modificado. Dentre as substâncias avaliadas, 7,4'-diidroxiflavana (**BPC-4**) apresentou a melhor atividade, com o diâmetro de halo de inibição (0,9 cm) igual ao da eserina (padrão de referência). (-)-Fisetinidol (**BPC-9**) foi avaliado quanto à atividade antibacteriana e o efeito modificador da ação antibiótica sobre cepas de *Staphylococcus aureus* (SA1199-B e ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), porém, não exibiu atividade antibacteriana frente às bactérias testadas, apresentando, portanto, valor de concentração inibitória mínima (CIM) maior que 1024 µg/mL. Vale ressaltar que na combinação do antibiótico norfloxacino com (-)-fisetinidol (**BPC-9**), foi possível observar redução de seu valor de CIM (1/4) em 2 vezes para 32 µg/mL. Quando comparado com a clorpromazina (inibidor clássico), observou-se significância, sendo isso um indicativo que houve reversão da resistência bacteriana.

Palavras-chave: *Bauhinia pentandra*; flavonoides; esteroides; derivados oxepínicos; acetilcolinesterase; atividade antibacteriana; resistência bacteriana.

ABSTRACT

The use of medicinal plants as a therapeutic resource is a popular knowledge that plays an important role in disease prevention and cure. Research has revealed that chemical constituents of plants of the genus *Bauhinia* exhibit various biological activities, such as acetylcholinesterase inhibitory, antibacterial, antibiotic modifier, cytotoxic, among others. However, there are still many species of this genus that need to be studied regarding the phytochemical profile. Thus, the present work reports the chemical and biological investigation of *B. pentandra* ethanolic stem extract (**EEBPS**), which resulted in the isolation and structural determination of eleven secondary metabolites: the mixture of steroids sitosterol and stigmasterol (**BPC-1a** and **BPC-1b**), two oxepin derivatives bauhiniastatin 1 (**BPC-2**) and bauhiniastatin 4 (**BPC-3**), seven 7,4'-dihydroxyflavan flavonoids (**BPC-4**), (2S)-liquiritigenin (**BPC-5**), (2S) - naringenin (**BPC-6**), isoliquiritigenin (**BPC-7**), poriol (**BPC-8**), (-)-fisetinidol (**BPC-9**) and fisetin (**BPC-10**). It is noteworthy that **BPC-8** is being described for the first time in the genus *Bauhinia* and with the exception of the steroid mixture, the other compounds are being reported for the first time in *B. pentandra* specie. The structures of the compounds were characterized by spectroscopic techniques such as IR, ¹H and ¹³C NMR and retention times of standard HPLC samples, in addition to comparison with data described in the literature. Ethanolic extract (**EEBPS**), as well as isolated compounds **BPC-2**, **BPC-3**, **BPC-4**, **BPC-5**, **BPC-6**, **BPC-7** and **BPC-10** were evaluated as acetylcholinesterase inhibitors using the modified Ellman's method. Among the evaluated substances, 7,4'-dihydroxyflavan (**BPC-4**) presented the best activity, with the inhibition halo diameter (0.9 cm) equal to that of eserine (reference standard). (-)-Fisetinidol (**BPC-9**) was evaluated for antibacterial activity and the modifying effect of antibiotic action on *Staphylococcus aureus* (SA1199-B and ATCC 25923), and *Escherichia coli* (ATCC 25922) strains, however, did not exhibit antibacterial activity against the bacteria tested, therefore presenting a minimum inhibitory concentration (MIC) value greater than 1024 µg/mL. It is noteworthy that in the combination of norfloxacin antibiotic with (-)-fisetinidol (**BPC-9**), it was possible to observe a reduction of its MIC value (1/4) 2 times to 32 µg/mL when compared with chlorpromazine (classic inhibitor), significance was observed, indicating that there was a reversal of bacterial resistance.

Keywords: *Bauhinia pentandra*; flavonoids; steroids; oxepin derivatives; acetylcholinesterase; atividade antibacteriana; resistência bacteriana.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Características morfológicas do gênero <i>Bauhinia</i>	21
Figura 2	– Fotografias de um espécime de <i>Bauhinia pentandra</i> (Bong.) D.Dietr.....	22
Figura 3	– Hidrólise da acetilcolina catalisada por acetilcolinesterase.....	29
Figura 4	– Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de BPC-1	32
Figura 5	– Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) de BPC-1	33
Figura 6	– Espectro de RMN ^{13}C -APT (75 MHz, CDCl_3) de BPC-1	34
Figura 7	– Estruturas do sitosterol e estigmasterol.....	35
Figura 8	– Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de BPC-2	37
Figura 9	– Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) de BPC-2	38
Figura 10	– Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CD_3OD) de BPC-2	39
Figura 11	– Esqueleto básico de BPC-2	39
Figura 12	– Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C -HMBC de BPC-2	41
Figura 13	– Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H x ^1H -COSY de BPC-2	42
Figura 14	– Estrutura da bauhiniastatina 1.....	42
Figura 15	– Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de BPC-3	44
Figura 16	– Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) de BPC-3	45
Figura 17	– Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CD_3OD) de BPC-3	46
Figura 18	– Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de BPC-3	46
Figura 19	– Esqueleto básico de derivado dibenzo[<i>b,f</i>]oxepínico.....	47
Figura 20	– Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C -HSQC de BPC-3	47
Figura 21	– Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C -HMBC de BPC-3	49

Figura 22 – Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C –HMBC de BPC–3	49
Figura 23 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H x ^1H –COSY de BPC–3	50
Figura 24 – Estrutura da bauhiniastatina 4.....	51
Figura 25 – Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de BPC–4	52
Figura 26 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) de BPC–4	53
Figura 27 – Espectro de RMN ^{13}C –BB (75 MHz, CD_3OD) de BPC–4	54
Figura 28 – Espectro de RMN ^{13}C –DEPT 135° de BPC–4	54
Figura 29 – Esqueleto básico de uma flavana.....	55
Figura 30 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C –HSQC de BPC–4	56
Figura 31 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C –HMBC de BPC–4	57
Figura 32 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H x ^1H –COSY de BPC–4	58
Figura 33 – Estrutura da 7,4'–diidroxiflavana.....	59
Figura 34 – Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de BPC–5	60
Figura 35 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) de BPC–5	61
Figura 36 – Espectro de RMN ^{13}C –BB (75 MHz, CD_3OD) de BPC–5	62
Figura 37 – Espectro de RMN ^{13}C –DEPT 135° de BPC–5	63
Figura 38 – Esqueleto básico de uma flavanona.....	63
Figura 39 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C –HSQC de BPC–5	64
Figura 40 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C –HMBC de BPC–5	65
Figura 41 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear ^1H x ^1H –COSY de	

BPC-5	66
Figura 42 – Estrutura da (2 <i>S</i>)-liquiritigenina.....	67
Figura 43 – Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de BPC-6	69
Figura 44 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD) de BPC-6	70
Figura 45 – Espectro de RMN ¹³ C-BB (75 MHz, CD ₃ OD) de BPC-6	71
Figura 46 – Estrutura da (2 <i>S</i>)-naringenina.....	72
Figura 47 – Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de BPC-7	73
Figura 48 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD) de BPC-7	74
Figura 49 – Espectro de RMN ¹³ C-BB (75 MHz, CD ₃ OD) de BPC-7	75
Figura 50 – Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° de BPC-7	75
Figura 51 – Esqueleto básico de BPC-7	76
Figura 52 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HSQC de BPC-7	76
Figura 53 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMBC de BPC-7	78
Figura 54 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear ¹ H x ¹ H-COSY de BPC-7	79
Figura 55 – Estrutura da isoliquiritigenina.....	80
Figura 56 – Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de BPC-8	81
Figura 57 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD) de BPC-8	82
Figura 58 – Espectro de RMN ¹³ C-BB (75 MHz, CD ₃ OD) de BPC-8	83
Figura 59 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HSQC de BPC-8	84
Figura 60 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMBC de BPC-8	85
Figura 61 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear ¹ H x ¹ H-COSY de BPC-8	86

Figura 62 – Estrutura do poriol.....	87
Figura 63 – Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de BPC-9	88
Figura 64 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD) de BPC-9	89
Figura 65 – Espectro de RMN ¹³ C-BB (75 MHz, CD ₃ OD) de BPC-9	90
Figura 66 – Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° de BPC-9	90
Figura 67 – Esqueleto básico de um flavan-3-ol.....	91
Figura 68 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HSQC de BPC-9	91
Figura 69 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMBC de BPC-9	93
Figura 70 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear ¹ H x ¹ H-COSY de BPC-9	94
Figura 71 – Estrutura do (-)-fisetinidol.....	95
Figura 72 – Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de BPC-10	96
Figura 73 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD) de BPC-10	97
Figura 74 – Espectro de RMN ¹³ C-BB (75 MHz, CD ₃ OD) de BPC-10	98
Figura 75 – Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° de BPC-10	98
Figura 76 – Esqueleto básico de um flavonol.....	99
Figura 77 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HSQC de BPC-10	99
Figura 78 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ¹ H x ¹³ C-HMBC de BPC-10	100
Figura 79 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear ¹ H x ¹ H-COSY de BPC-10	101
Figura 80 – Estrutura da fisetina.....	102
Figura 81 – Efeito da atividade modificadora de antibióticos do (-)-fisetinidol (BPC-9) contra <i>S. aureus</i> (1199-B) utilizando o Norfloxacino como controle	

positivo.....	105
Figura 82 – Efeito da atividade modificadora de antibióticos do (-)-fisetinidol (BPC-9) contra <i>S. aureus</i> (1199-B) utilizando brometo de etídio (EtBr) como marcador.....	106
Figura 83 – Cromatograma referente ao isolamento de BPC-3	121
Figura 84 – Cromatograma referente ao isolamento de BPC-4	122
Figura 85 – Cromatogramas referentes aos compostos padrões, liquiritigenina (a), naringenina (b) e isolamento de BPC-5 , BPC-6 , BPC-7 e BPC-8 (c).....	124
Figura 86 – Cromatograma referente ao isolamento de BPC-10	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Atividades biológicas de compostos isolados de <i>Bauhinia pentandra</i>	25
Tabela 2	– Dados espectroscópicos referentes a mistura*/** de BPC-1a (sitosterol*) e BPC-1b (estigmasterol**) comparados com os dados descritos na literatura (SILVA <i>et al.</i> , 2012).....	36
Tabela 3	– Dados espectroscópicos de RMN de BPC-2 comparados com os dados descritos na literatura (PETTIT <i>et al.</i> , 2006) para a bauhiniastatina 1).....	43
Tabela 4	– Dados espectroscópicos de RMN de BPC-3 comparados com os dados descritos na literatura (PETTIT <i>et al.</i> , 2006) para a bauhiniastatina 4).....	51
Tabela 5	– Dados espectroscópicos de BPC-4 comparados com os dados descritos na literatura (ZHENG; ZHANG; YANG, 2006) para a 7,4'-diidroxiflavona.....	59
Tabela 6	– Dados espectroscópicos de BPC-5 comparados com os dados descritos na literatura (ZHANG <i>et al.</i> , 2018b) para a (2S)-4',7-diidroxiflavanona (liquiritigenina).....	68
Tabela 7	– Dados espectroscópicos de BPC-6 comparados com os dados descritos na literatura (ZEKRY <i>et al.</i> , 2015) para a (2S)-4',5,7-triidroxiflavanona (naringenina).....	72
Tabela 8	– Dados espectroscópicos de BPC-7 comparados com os dados descritos na literatura (KHAMSAN <i>et al.</i> , 2012) para a 2',4',4-triidroxichalcona (isoliquiritigenina).....	80
Tabela 9	– Dados espectroscópicos de BPC-8 comparados com os dados descritos na literatura (NOBAKHT <i>et al.</i> , 2014) para a 6-metil-5,7,4'-triidroxiflavanona (poriol).....	87
Tabela 10	– Dados espectroscópicos de BPC-9 comparados com os dados descritos na literatura (COSTA <i>et al.</i> , 2014) para o (-)-fisetinidol.....	95
Tabela 11	– Dados espectroscópicos de BPC-10 comparados com os dados descritos na literatura (COSTA <i>et al.</i> , 2014) para a 3,3',4',7-tetraidroxiflavona (fisetina).....	102

Tabela 12	– Resultado referente à inibição da enzima acetilcolinesterase das amostras testadas.....	103
Tabela 13	– Valores de concentração inibitória mínima do (-)-fisetinidol (BPC-9).....	104
Tabela 14	– Frações resultantes do tratamento cromatográfico do EECBP	115
Tabela 15	– Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da FABPC	116
Tabela 16	– Frações resultantes do tratamento cromatográfico da FABPC	116
Tabela 17	– Frações resultantes do tratamento cromatográfico de FABPC (6')	117
Tabela 18	– Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de FABPC (15 – 16) .	117
Tabela 19	– Frações resultantes do tratamento cromatográfico de FABPC (15 – 16) ...	118
Tabela 20	– Frações resultantes do tratamento cromatográfico de FABPC (30 – 49) ...	118
Tabela 21	– Frações resultantes do tratamento cromatográfico de FABPC (13 – 26) ...	119
Tabela 22	– Frações resultantes do tratamento cromatográfico de FABPC (63 – 84) ...	119
Tabela 23	– Frações resultantes do tratamento cromatográfico de FABPC (19 – 23) ...	120
Tabela 24	– Frações resultantes do tratamento cromatográfico de FABPC (85 – 104) .	121
Tabela 25	– Frações resultantes do tratamento cromatográfico de FABPC (24 – 30) ...	122
Tabela 26	– Frações resultantes do tratamento cromatográfico de FABPC (114 – 117)	123
Tabela 27	– Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de FABPC (24 – 25) .	125
Tabela 28	– Frações resultantes do tratamento cromatográfico de FABPC (24 – 25) ...	125
Tabela 29	– Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de 136 – 150 de FABPC (24 – 25)	126
Tabela 30	– Frações resultantes do tratamento cromatográfico de FABPC (136 – 150)	126
Tabela 31	– Dados da extração em EFS da fração 100 – 269 de FABPC (136 – 150) ..	127
Tabela 32	– Frações resultantes do tratamento cromatográfico de FABPC (100 – 269)	127
Tabela 33	– Frações resultantes do tratamento cromatográfico de FABPC (3)	128

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
BB	<i>Broad Band</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
EEBPC	Extrato etanólico do caule de <i>Bauhinia pentandra</i>
FABPC	Fração acetato de etila do extrato etanólico do caule de <i>Bauhinia pentandra</i>
FAMBPC	Fração acetato de etila/metanol do extrato etanólico do caule de <i>Bauhinia pentandra</i>
FDBPC	Fração diclorometano do extrato etanólico do caule de <i>Bauhinia pentandra</i>
FHBPC	Fração hexânica do extrato etanólico do caule de <i>Bauhinia pentandra</i>
FMBPC	Fração metanólica do extrato etanólico do caule de <i>Bauhinia pentandra</i>
GPS	<i>Global Positioning System</i>
Hz	Hertz
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Connectivity</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IDH	Índice de Deficiência de Hidrogênio
IV	Infravermelho
MHz	Mega hertz
<i>m</i>	Multiplete
p.f.	Ponto de fusão
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<i>s</i>	Simpleto
<i>t</i>	Triplete
UV-Vis	Ultravioleta visível

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
L	Comprimento
J	Constante de acoplamento
δ_C	Deslocamento químico de Carbono-13
δ_H	Deslocamento químico de Hidrogênio
Φ	Diâmetro
°C	Graus Celsius
®	Marca registrada
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS.....	20
2.1	Família Fabaceae.....	20
2.2	Subfamília Caesalpinioideae.....	20
2.3	O gênero <i>Bauhinia</i>	21
2.4	A espécie <i>Bauhinia pentandra</i>	22
3	OBJETIVOS.....	23
3.1	Objetivo geral.....	23
3.2	Objetivos específicos.....	23
4	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
4.1	Levantamento bibliográfico sobre os metabólitos secundários isolados de <i>Bauhinia pentandra</i>	24
4.2	Atividades biológicas.....	29
4.2.1	<i>Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase</i>	29
4.2.2	<i>Atividade antibacteriana e modificadora da ação antibiótica</i>	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1	Determinação estrutural dos metabólitos secundários isolados de <i>Bauhinia pentandra</i>	32
5.1.1	<i>Determinação estrutural de BPC-1</i>	32
5.1.2	<i>Determinação estrutural de BPC-2</i>	37
5.1.3	<i>Determinação estrutural de BPC-3</i>	44
5.1.4	<i>Determinação estrutural de BPC-4</i>	52
5.1.5	<i>Determinação estrutural de BPC-5</i>	60
5.1.6	<i>Determinação estrutural de BPC-6</i>	69
5.1.7	<i>Determinação estrutural de BPC-7</i>	73
5.1.8	<i>Determinação estrutural de BPC-8</i>	81
5.1.9	<i>Determinação estrutural de BPC-9</i>	88
5.1.10	<i>Determinação estrutural de BPC-10</i>	96
5.2	Atividades biológicas.....	103
5.2.1	<i>Avaliação da atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase</i>	103
5.2.2	<i>Avaliação da atividade antibacteriana e modificadora da ação antibiótica do</i>	

	<i>(-)-fisetinidol sobre linhagens de bactérias Gram (+) e Gram (-)</i>	104
5.2.2.1	<i>Atividade antibacteriana</i>	104
5.2.2.2	<i>Avaliação da atividade modificadora da ação antibiótica</i>	104
5.2.2.3	<i>Inibição de efluxo pela redução do CIM do brometo de etídeo (EtBr)</i>	105
6	PARTE EXPERIMENTAL	108
6.1	Material vegetal	108
6.2	Métodos analíticos	108
6.2.1	Métodos cromatográficos	108
6.2.1.1	<i>Cromatografia de adsorção em coluna (CC)</i>	108
6.2.1.2	<i>Cromatografia de adsorção em camada delgada (CCD)</i>	109
6.2.1.3	<i>Extração em fase sólida (EFS)</i>	109
6.2.1.4	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</i>	109
6.2.2	Métodos físicos de análise	110
6.2.2.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)</i>	110
6.2.2.2	<i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	110
6.2.2.3	<i>Ponto de fusão</i>	111
6.3	Ensaio de atividades biológicas	111
6.3.1	Ensaio para inibição da enzima acetilcolinesterase	111
6.3.2	Atividade antibacteriana e o efeito modificador da ação antibiótica sobre linhagens de bactérias Gram (+) e Gram (-)	112
6.3.2.1	<i>Reagentes</i>	112
6.3.2.2	<i>Cepas microbianas</i>	112
6.3.2.3	<i>Preparo dos inóculos</i>	112
6.3.2.4	<i>Substâncias testes</i>	112
6.3.2.5	<i>Concentração inibitória mínima (CIM)</i>	113
6.3.2.6	<i>Efeito modificador da ação antibiótica</i>	113
6.3.2.7	<i>Inibição de bomba de efluxo por redução da CIM do brometo de etídio</i>	113
6.3.2.8	<i>Análise estatística</i>	114
6.4	Estudo dos constituintes fixos de <i>Bauhinia pentandra</i>	115
6.4.1	Obtenção do extrato etanólico do caule de <i>B. pentandra</i> (EEBPC)	115
6.4.1.1	<i>Fracionamento cromatográfico do EEBPC</i>	115
6.4.1.2	<i>Tratamento cromatográfico da fração acetato de etila (FABPC)</i>	115
6.4.1.3	<i>Tratamento cromatográfico da fração 6' de FABPC e isolamento de BPC-1</i> ...	117

6.4.1.4	<i>Fracionamento cromatográfico da fração 15 – 16 de FABPC</i>	117
6.4.1.5	<i>Tratamento cromatográfico da fração 30 – 49 de FABPC (15 – 16) e isolamento de BPC-2</i>	118
6.4.1.6	<i>Fracionamento cromatográfico da fração 63 – 84 de FABPC (15 – 16)</i>	119
6.4.1.7	<i>Tratamento cromatográfico da fração 19 – 23 de FABPC (63 – 84)</i>	120
6.4.1.8	<i>Tratamento cromatográfico da fração 22 – 29 de FABPC (19 – 23) e isolamento de BPC-3</i>	120
6.4.1.9	<i>Fracionamento cromatográfico da fração 85 – 104 de FABPC (15 – 16)</i>	121
6.4.1.10	<i>Tratamento cromatográfico da fração 24 – 30 de FABPC (85 – 104)</i>	121
6.4.1.11	<i>Tratamento cromatográfico da fração 15 – 18 de FABPC (24 – 30) e isolamento de BPC-4</i>	122
6.4.1.12	<i>Tratamento cromatográfico da fração 114 – 117 de FABPC (15 – 16)</i>	123
6.4.1.13	<i>Tratamento cromatográfico das frações 20 – 48 de FABPC (114 – 117); 17–18 de FABPC e isolamento de BPC-5, BPC-6, BPC-7 e BPC-8</i>	123
6.4.1.14	<i>Tratamento cromatográfico da fração 24 – 25 de FABPC</i>	125
6.4.1.15	<i>Tratamento cromatográfico da fração 136 – 150 de FABPC (24 – 25)</i>	126
6.4.1.16	<i>Extração em fase sólida (EFS) da fração 100 – 269 de FABPC (136 – 150)</i>	127
6.4.1.17	<i>Tratamento cromatográfico da fração 1 de FABPC (100 – 269) e isolamento de BPC-9</i>	127
6.4.1.18	<i>Tratamento cromatográfico da fração 3 de FABPC (100 – 269)</i>	128
6.4.1.19	<i>Tratamento cromatográfico da fração 95 – 125 de FABPC (3) e isolamento de BPC-10</i>	128
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	130
	REFERÊNCIAS	131

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais no tratamento de diversas doenças constitui uma das mais antigas formas de aplicação destas, estando presente nas culturas de várias nações (MALIK *et al.*, 2018; TESFAHUNEYGN; GEBREEGZIABHER, 2019; WHO, 2019). No entanto, esse uso, muitas vezes, é feito somente com base no conhecimento popular e sem o devido conhecimento científico (PIO *et al.*, 2019). Dessa forma, a realização de estudos na busca por compostos responsáveis pelas ações terapêuticas de plantas medicinais vem sendo um dos principais focos das indústrias farmacêuticas (DE LA TORRE; ALBERICIO, 2019).

Vale ressaltar o projeto Farmácias Vivas que foi criado na Universidade Federal do Ceará pelo Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos (*In memoriam*), surgiu a partir da união da sabedoria popular com o conhecimento científico. Esse projeto já investigou diversos gêneros e espécies de plantas medicinais, confirmando suas funções terapêuticas oriundas da raiz, da casca, da folha, da flor ou do fruto das árvores ou das ervas presentes na região, atribuídas previamente pelos sertanejos. As Farmácias Vivas trabalham em três categorias: Básica, na qual a população, devidamente orientada, cultiva algumas espécies vegetais, podendo preparar xaropes e chás em suas comunidades; Intermediária, nas qual as plantas são dessecadas para produção de chás em saquinhos (sachês) e avançada, para atender com remédios aos setores de saúde em maior proporção (MOREIRA, 2013).

Dentre as diversas espécies vegetais de interesse medicinal, podemos destacar as do gênero *Bauhinia* (família Fabaceae), encontradas principalmente nas áreas tropicais do planeta, possuindo aproximadamente 300 a 500 espécies e utilizadas na medicina popular em várias regiões do mundo, incluindo África, Ásia, América Central e do Sul (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002; SOARES; SCARMINIO, 2008; KERNTOPF; NASCIMENTO; FONTELES, 2013). Vale ressaltar que estudos químicos e biológicos realizados com estas plantas demonstraram que as mesmas são constituídas principalmente de flavonoides (CECHINEL-ZANCHETT *et al.*, 2019; SANTOS; FORTUNATO; SPOTORNO, 2019), apresentando também triterpenos, esteroides (FERRARI; DE OLIVEIRA; ARAGÃO, 2019), terpenoides (GOVINDULA *et al.*, 2019) e lactonas (ALMEIDA *et al.*, 2017).

No Brasil, as plantas do gênero *Bauhinia*, devido ao formato bilobado de suas folhas (PEREIRA *et al.*, 2018), são conhecidas como “pata-de-vaca” ou “mororó”, sendo empregadas pela população em forma de chás no tratamento de enfermidades, principalmente infecções, dores e diabetes. Dentre as espécies desse gênero, as mais utilizadas no Brasil e em

outros países são *B. manca*, *B. rufescens*, *B. forficata*, *B. cheitantha* e *B. splendens*. Além disso, são utilizadas contra cistites, parasitoses intestinais e elefantíase (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002; CECHINEL FILHO, 2009; NOGUEIRA; SABINO, 2012).

Estudos relataram propriedades biológicas de extratos de espécies de *Bauhinia*, tais como atividade antidiabética para *B. racemosa* (GAWADE; FAROOQUI, 2018), antibacteriana para *B. variegata* (GAD EL-MOULA *et al.*, 2019) e anti-hiperlipidêmica para *B. acuminata* (GOVINDULA *et al.*, 2019). Pesquisas também confirmaram propriedades anti-inflamatória e analgésica para o extrato hidro-metanólico de *B. uruguayensis* (SANTOS; FORTUNATO; SPOTORNO, 2019). Além disso, substâncias isoladas de espécies desse gênero exibiram diversas atividades biológicas, tais como inibitória da enzima acetilcolinesterase (MUHAMMAD *et al.*, 2018), antibacteriana (CHEW *et al.*, 2018), modificadora de antibióticos (FARIAS *et al.*, 2015), citotóxica (SHARMA *et al.*, 2019), antioxidante (SHARMA *et al.*, 2019), anti-dengue (SANTOS *et al.*, 2019).

Bauhinia pentandra (Bong.) D.Dietr., vulgarmente conhecida como “mororó-de-espinho” (MATOS, 2002) se refere a uma espécie de planta que habita os biomas Caatinga e Savana. No Brasil, é encontrada nos seguintes estados: Ceará, Alagoas, Bahia, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, São Paulo e Sergipe. Já na região Nordeste, essa espécie está presente também na Caatinga, transição Caatinga/Cerrado e floresta estacional. Relata-se que a casca do caule pode ser usada na medicina popular como tônico depurativo e no tratamento do diabetes do tipo 1 (AGRA *et al.*, 2008). Vale ressaltar que a *B. pentandra* ainda não teve comprovação de sua propriedade antidiabética.

Um levantamento bibliográfico realizado sobre a espécie *B. pentandra* utilizando a ferramenta SciFinder[®], foi possível constatar que são escassos os estudos sobre a composição química e atividades biológicas de extratos brutos, frações e/ou compostos isolados dessa espécie. Dos 12 artigos publicados, 4 estão relacionados somente ao estudo fitoquímico, 5 ao estudo fitoquímico e atividades biológicas, 2 à análise filogenética e 1 artigo referente ao estudo *in silico*. Desta forma, estas informações serviram como estímulo à investigação química e avaliação biológica dessa espécie. O presente trabalho trata-se do isolamento e caracterização de metabólitos secundários, assim como a avaliação das atividades biológicas inibitória da enzima acetilcolinesterase, antibacteriana, modificadora de antibióticos.

2 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

2.1 Família Fabaceae

A família Fabaceae, conhecida anteriormente como Leguminosae, apresenta distribuição cosmopolita, representando o terceiro maior grupo das angiospermas, com aproximadamente 751 gêneros e 19.500 espécies registradas. Está dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Faboideae e Mimosoideae, sendo encontrada em quase todos os ambientes terrestres, com exceção das regiões polares (LPWG, 2013). São representadas por árvores, arbustos, lianas ou ervas e fruto normalmente do tipo legume (SOUZA; LORENZI, 2012).

Vale destacar que no Brasil, a família Fabaceae é reconhecida como uma das mais importantes, sendo também apontada como a maior família botânica. Possui 2.100 espécies e 188 gêneros, sendo que 31 são endêmicos, estando presente em todos os biomas brasileiros (LIMA *et al.*, 2010). As espécies dessa família são bem características em diversidade e densidade nos ecossistemas brasileiros, possuindo grande relevância econômica e ecológica para o país, devido à ampla variedade de espécies vegetais utilizadas como fonte de produtos alimentícios, medicinais, ornamentais, madeireiros, fibras, corantes, gomas, resinas e óleos (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; WATSON; DALLWITZ, 2009).

2.2 Subfamília Caesalpinioideae

Na subfamília Caesalpinioideae estão catalogados 179 gêneros e 2.250 espécies amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da América do Sul, África e Sudeste Asiático, incorporando quatro tribos: Cercideae, Detarieae, Cassieae e Caesalpineae. Em relação à família Fabaceae, a subfamília Caesalpinioideae é a menos estudada por ser bastante diversificada, sendo considerada a mais remota (LPWG, 2013).

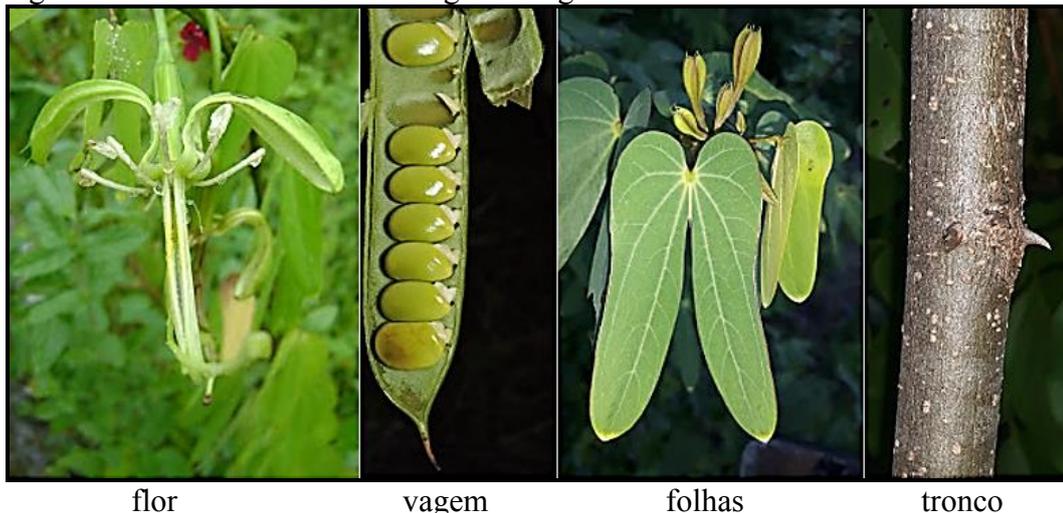
Destaca-se que inúmeras espécies vegetais nativas fazem parte dessa subfamília e a maior parte delas ostentam significativa presença no paisagismo, sendo fundamentais na arborização urbana e espaços de jardins campestres (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; WATSON; DALLWITZ, 2009). Dentre os gêneros da subfamília Caesalpinioideae, o gênero *Bauhinia* que pertence à tribo Cercideae, é considerado um dos mais importantes (TOZZI *et al.*, 2016).

2.3 O gênero *Bauhinia*

O gênero *Bauhinia* é dedicado aos irmãos Bahuin, botânicos suíços do século XVI. As plantas referentes a esse gênero são encontradas nas regiões tropicais do planeta, compreendendo aproximadamente 300 a 500 espécies, conhecidas popularmente como “mororó” ou “pata de vaca” devido ao formato bilobado de suas folhas (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002; CECHINEL-FILHO, 2009; SOARES; SCARMINIO, 2008). São bastante utilizadas na medicina popular brasileira por sua atividade antidiabética (KERNTOPF; NASCIMENTO; FONTELES, 2013).

As espécies desse gênero apresentam-se como árvores, arbustos e cipós, com típicas folhas bigeminadas, paripeneadas, grandes, ramificadas, unijugadas, glabras, geminadas com os folíolos trinervados por vezes, estípulas estreitas e caducas. Ressalta-se que as flores são grandes, algumas semelhantes a uma orquídea; corola com cinco pétalas desiguais, androceu diplostêmone, às vezes com alguns estames reduzidos a estaminódios ou ausentes, gineceu com ovário unilocular com óvulos bisseriados, estiletes livres ou consorcados. Os frutos são do tipo vagem, chatos, escuros e compridos, indeiscentes ou deiscentes, bivalvares, oblongos, com sementes, também, achatadas (Figura 1) (KERNTOPF; NASCIMENTO; FONTELES, 2013).

Figura 1 – Características morfológicas do gênero *Bauhinia*



flor

vagem

folhas

tronco

Fonte: adaptado de <http://rubens-plantasdobrasil.blogspot.com/2011/11/bauhinia-pentandra-bong-vogel-ex-steud.html>

2.4 A espécie *Bauhinia pentandra*

Bauhinia pentandra (Bong.) D.Dietr. (Figura 2), conhecida como “mororó-de-espinho”, habita os biomas caatinga e savana. São arvoretas medindo em torno de 4,5 metros ou arbustos com alturas entre 0,5 a 3,5 metros, escandentes com ramos contendo acúleos rígidos em direção ao ápice, folhas bifoliadas e inflorescências parciais com pétalas lineares. O legume dessa espécie possui contorno estreitamente oblongo, sem divisões internas, contudo sem câmaras que alojam as sementes as quais não apresentam apêndice unciforme encobrindo o hilo, e sem linhas em leque (VAZ; TOZZI, 2005; CRISÓSTOMO, 2008).

Figura 2 – Fotografias de um espécime de *Bauhinia pentandra* (Bong.) D.Dietr.



Fonte: próprio autor.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Contribuir para o conhecimento químico e biológico de *Bauhinia pentandra* (Bong.) D.Dietr.

3.2 Objetivos específicos

- Preparar o extrato etanólico do caule de *B. pentandra*;
- Obter as frações hexânica, diclorometano, acetato de etila e metanólica do extrato etanólico do caule de *B. pentandra*;
- Isolar e purificar, através de técnicas cromatográficas, os constituintes químicos de *B. pentandra*;
- Caracterizar estruturalmente os compostos isolados através de técnicas espectroscópicas, tais como IV, RMN ^1H e ^{13}C (uni e bidimensional);
- Avaliar a atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase do extrato etanólico (EEBPC) e de alguns compostos isolados;
- Avaliar a atividade antibacteriana do (-)-fisetinidol e o efeito modificador da ação antibiótica sobre cepas de *Staphylococcus aureus* (SA1199-B), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922).

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Levantamento bibliográfico sobre os metabólitos secundários isolados de *Bauhinia pentandra*

Na revisão de literatura realizada utilizando a base de dados Scifinder[®], abrangendo todos os artigos publicados sobre a espécie *Bauhinia pentandra* pode-se verificar que existem poucos estudos sobre a composição química e atividades biológicas dessa espécie. Inicialmente, foram encontrados 12 artigos. Desses, apenas 9 estavam relacionados ao isolamento de metabólitos secundários. Porém, dentre os 9, somente 5 apresentaram também atividades biológicas dos compostos isolados. Devido a isso, foram incluídos na pesquisa alguns trabalhos publicados como teses e dissertações.

A Tabela 1 (pág. 25) apresenta as estruturas dos metabólitos secundários isolados da espécie *B. pentandra* e algumas atividades biológicas. Nesse levantamento bibliográfico, foi possível observar a presença de algumas classes de compostos, tais como cianoglicosídeos, flavonoides, além de mistura de esteroides, de ácidos graxos e de derivados do ácido fenilacético. Dentre os flavonoides foram constatados o isolamento do kaempferol (**11**) e da quercetina (**12**). Destaca-se também o isolamento do D-pinitol (**8**) (ciclitol), riachina (**6**) e cianoglicosídeos. Vale ressaltar que os constituintes químicos isolados dessa espécie exibem diferentes atividades biológicas como inibitória da acetilcolinesterase, modificadora de antibióticos, anti-inflamatória, antioxidante, hipoglicemiante e anticâncer (ALI *et al.*, 2015; KERNTOPF; NASCIMENTO; FONTELES, 2013; ADEDARA *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2017; ARAÚJO *et al.*, 2019).

Tabela 1 – Atividades biológicas de compostos isolados de *Bauhinia pentandra* (continua)

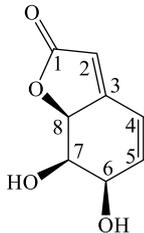
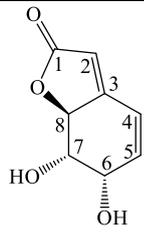
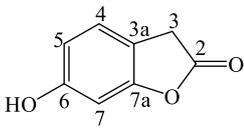
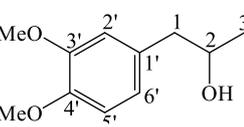
Composto	Atividade biológica
 <p style="text-align: center;">1</p>	—
<p>[(6<i>R</i>,7<i>R</i>,7<i>aS</i>)-7,7<i>a</i>-diidro-6,7-diidroxi-benzofurano-2(6<i>H</i>)-ona] (ALMEIDA <i>et al.</i>, 2017)</p>	
 <p style="text-align: center;">2</p>	—
<p>[(6<i>S</i>,7<i>S</i>,7<i>aS</i>)-7,7<i>a</i>-diidro-6,7-diidroxi-benzofuran-2(6<i>H</i>)-ona] (ALMEIDA <i>et al.</i>, 2017)</p>	
 <p style="text-align: center;">3a</p>	
 <p style="text-align: center;">3b</p>	—
<p>Mistura de 6-hidroxi-benzofuran-2(3<i>H</i>)-ona (3a) e do fenilpropanoide 1-(3',4'-dimetoxifenil)-2-propanol (3b) (ALMEIDA, 2015)</p>	

Tabela 1 – Atividades biológicas de compostos isolados de *Bauhinia pentandra* (continuação)

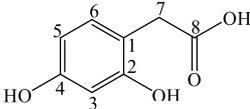
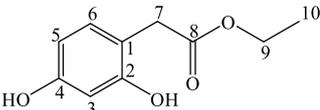
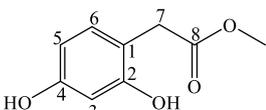
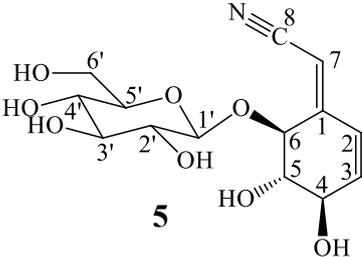
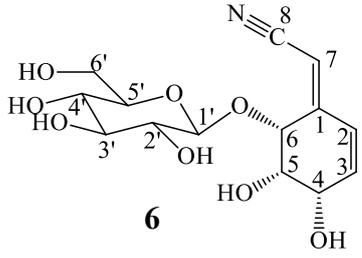
Composto	Atividade biológica
 <p style="text-align: center;">4a</p>	Antimicrobiana (4a) (WAGLE <i>et al.</i> , 2017)
 <p style="text-align: center;">4b</p>	Antimicrobiana (4b) (UNO <i>et al.</i> , 1981)
 <p style="text-align: center;">4c</p>	Antioxidante (4c) (WU <i>et al.</i> , 2014)
Mistura de derivados do ácido fenilacético: ácido 2,4-diidroxifenilacético (4a), 2,4-diidroxifenilacetato de etila (4b) e 2,4-diidroxifenilacetato de metila (4c) (ALMEIDA <i>et al.</i> , 2017)	
 <p style="text-align: center;">5</p>	Antioxidante (LINS, 2008)
Glicosídeo cianogênico litospermosida (LINS, 2008)	
 <p style="text-align: center;">6</p>	Antioxidante (SILVA <i>et al.</i> , 2013)
Riachina (ALMEIDA <i>et al.</i> , 2017)	
Modificadora de antibióticos (FARIAS <i>et al.</i> , 2015)	

Tabela 1 – Atividades biológicas de compostos isolados de *Bauhinia pentandra* (continuação)

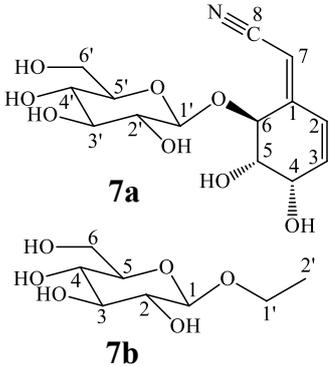
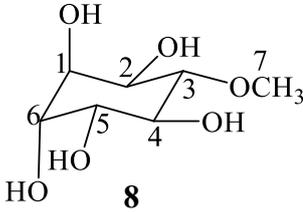
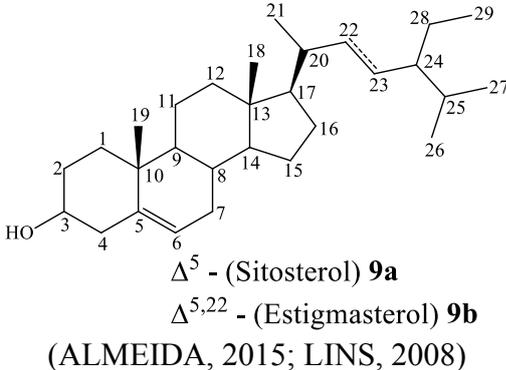
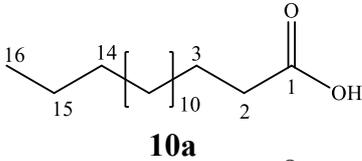
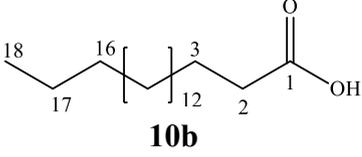
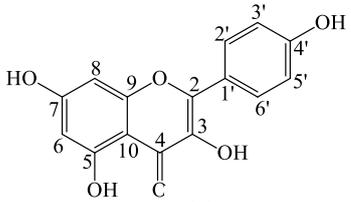
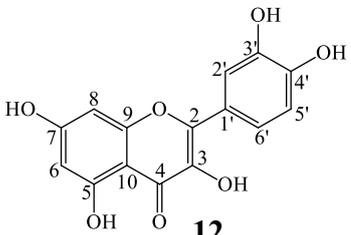
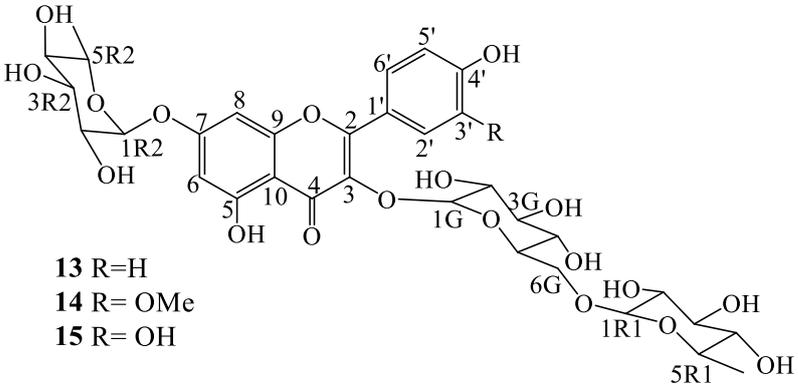
Composto	Atividade biológica
 <p>7a</p> <p>7b</p>	—
Mistura de cianoglucósido (7a) e glucopiranosídeo (7b) (ALMEIDA <i>et al.</i> , 2017)	
 <p>8</p>	Hipoglicemiante (KERNTOPF; NASCIMENTO; FONTELES, 2013)
D-pinitol (CONCEIÇÃO, 2015; ALMEIDA, 2015)	Antitumoral (RENGARAJAN <i>et al.</i> , 2014)
 <p>Δ^5 - (Sitosterol) 9a</p> <p>$\Delta^{5,22}$ - (Stigmasterol) 9b</p>	Anti-inflamatória (9a) (ARAÚJO <i>et al.</i> , 2019)
(ALMEIDA, 2015; LINS, 2008)	Anticâncer (9b) (ALI <i>et al.</i> , 2015)
 <p>10a</p>	Antitumoral (10a) (HARADA, <i>et al.</i> , 2002)
 <p>10b</p>	Anticâncer (10b) (EVANS <i>et al.</i> , 2009)
Mistura de ácidos graxos: Ácido palmítico (10a) e Ácido esteárico (10b) (ALMEIDA, 2015)	

Tabela 1 – Atividades biológicas de compostos isolados de *Bauhinia pentandra* (conclusão)

Composto	Atividade biológica
 <p>11 Kaempferol (CONCEIÇÃO, 2015)</p>	<p>Antidepressiva (PARK <i>et al.</i>, 2010)</p> <p>Anti-inflamatória (ZHU <i>et al.</i>, 2017)</p> <p>Antioxidante (WANG <i>et al.</i>, 2018)</p> <p>Neuroprotetora (CHENG <i>et al.</i>, 2018)</p>
 <p>12 Quercetina (CONCEIÇÃO, 2015)</p>	<p>Inibitória da acetilcolinesterase; Antioxidante (ADEDARA <i>et al.</i>, 2017)</p> <p>Neuroprotetora (CHEN <i>et al.</i>, 2017)</p>
 <p>13 R=H 14 R= OMe 15 R= OH</p>	—
<p>3-<i>O</i>-[β-D-glicopiranosil-(1→6)-α-L-ramnopiranosil]-7-<i>O</i>-α-L-ramnopiranosilkanferol(13), 3-<i>O</i>-[β-D-glucopiranosil-(1→6)-α-L-ramnopiranosil]-7-<i>O</i>-α-L-ramnopiranosil-3'-metoxiquercetina (14) e 3-<i>O</i>-[β-D-glucopiranosil-(1→6)-α-L-ramnopiranosil]-7-<i>O</i>-α-L-ramnopiranosilquercetina (15) (CONCEIÇÃO, 2015)</p>	

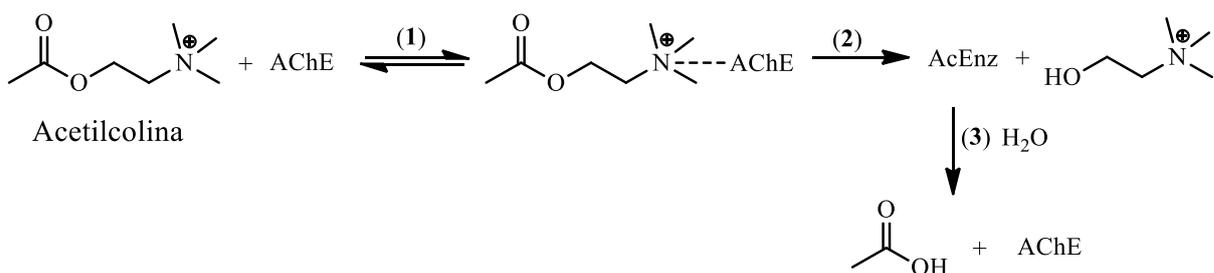
4.2 Atividades biológicas

4.2.1 Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase

Acetilcolina (ACh) é considerada um dos neurotransmissores excitatórios fundamentais, desempenhando importante papel no sistema nervoso central (SNC) e no sistema periférico. Vale destacar que o SNC é constituído pelo encéfalo e pela medula espinhal, estando também relacionado com dois processos cognitivos: memória e aprendizagem. A ACh exerce várias funções cognitivas, dentre elas, o processamento de informações sensoriais (VIEGAS JÚNIOR *et al.*, 2005; BRUNEAU *et al.*, 2005).

A reação da enzima acetilcolinesterase (AChE) com a ACh (Figura 3) ocorre em três etapas: (1) formação do complexo de Michaelis entre o substrato, ACh e AChE; (2) acetilação da enzima e formação de colina e (3) hidrólise da enzima acetilada para formar a enzima livre e ácido acético (DUBEY; PATYAL, 2007; LOPEZ; FERNANDEZ-BOLANOS, 2011; REDDY, 2015). A AChE tem sido foco de estudos para o tratamento de doenças neurodegenerativas progressivas como o mal de Alzheimer e Parkinson, pela restauração da função colinérgica, por meio do aumento do nível de acetilcolina (VIEGAS JÚNIOR *et al.*, 2005; BRUNEAU *et al.*, 2005).

Figura 3 – Hidrólise da acetilcolina catalisada por acetilcolinesterase



Fonte: adaptado de Lopez e Fernandez-Bolanos (2011).

Os medicamentos mais avançados empregados para o tratamento dos sintomas do mal de Alzheimer elevam os níveis de acetilcolina pela inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE). Dentre os fármacos utilizados para tratar essa doença, a galantamina, alcalóide anticolinesterásico, se destaca por ser considerada um medicamento mais efetivo, entretanto, outras classes de substâncias também podem inibir a

acetilcolinesterase (GIORDANI *et al.*, 2008), como por exemplo os compostos fenólicos (TASLIMI; CAGLAYAN; GULCIN, 2017). Vale salientar que essa inibição não pode ser excessiva, uma vez que causa uma alta atividade dos receptores colinérgicos, provocando prováveis efeitos tóxicos relacionados a alterações comportamentais, tais como hiperatividade e asfixia, podendo levar à morte (WALKER, 2001).

A literatura relata diferentes metodologias para determinar a inibição da enzima acetilcolinesterase, uma delas consiste em um pré-teste qualitativo, sendo considerado um método rápido e sensível para a seleção de amostras com ação anticolinesterásica. Nos inibidores da acetilcolinesterase ocorre a formação de um halo branco em torno dos *spots* na placa de cromatografia em camada delgada (CCD) (ARAÚJO, SANTOS, GONSALVES, 2016). Vale destacar que o alcaloide eserina (fisostigmina) pode ser utilizado como controle positivo para determinar a sensibilidade do método (MARSTON, 2002; MANS *et al.*, 2014).

4.2.2 Atividade antibacteriana e modificadora da ação antibiótica

A partir da descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928, o uso descontrolado de antibióticos acarretou inúmeras implicações para o tratamento de doenças bacterianas (LANDERS *et al.*, 2012). Portanto, com o avanço da medicina, as enfermidades contagiosas originadas por bactérias, vírus, fungos e parasitas ainda tem se tornado uma imensa ameaça à saúde pública (SAMPAIO; SANCHO; LAGO, 2018).

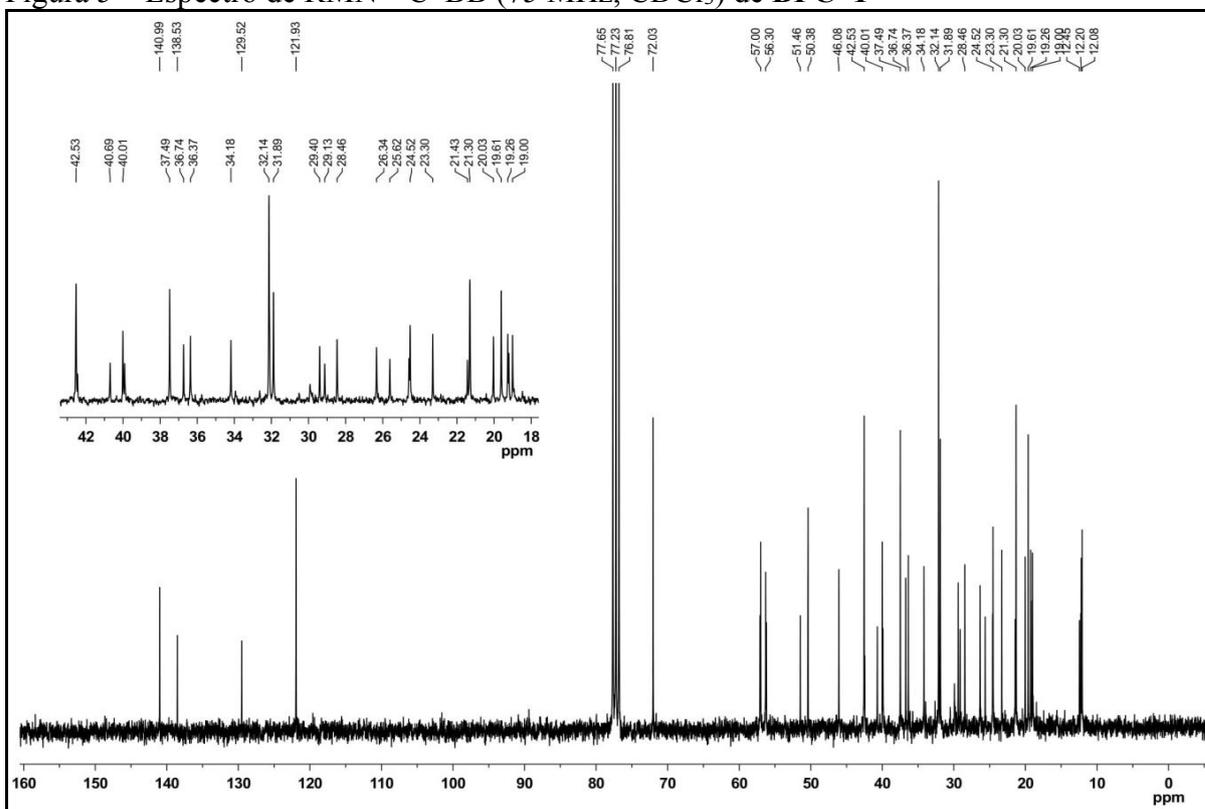
A utilização desenfreada de antimicrobianos acabou resultando em um perigo para a humanidade, especialmente por favorecer a evolução de cepas bacterianas resistentes, em reposta ao desenvolvimento e excessiva pressão decorrente da exposição a esses compostos. O surgimento de linhagens com resistência múltipla aos antibacterianos já conhecidos no mercado tem incentivado a procura por novas substâncias naturais que possuam, simultaneamente, propriedades de alta eficiência e baixa toxicidade (SOUSA, 2017).

As estratégias mais comuns envolvem modificar as estruturas químicas dos medicamentos existentes, com a finalidade de torná-los mais eficazes ou capazes de recuperar sua atividade perdida por causa da presença de mecanismos de resistência bacteriana (FARIAS *et al.*, 2015). Conseqüentemente, produtos naturais, principalmente os de origem vegetal, têm sido identificados não somente por apresentar atividade antimicrobiana, mas também por serem capazes de potencializar a atividade antibiótica (TINTINO *et al.*, 2013).

Em função da crescente demanda por produtos naturais bioativos, ocorre, atualmente, um maior interesse por extratos e/ou compostos isolados de espécies vegetais. As plantas são fontes abundantes de metabólitos biologicamente ativos, produzindo substâncias que podem ser de interesse da indústria farmacêutica (DE LA TORRE; ALBERICIO, 2019). Estudos utilizando produtos naturais ou substâncias ativas de plantas com atividade antibiótica obtiveram resultados satisfatórios (CHEW *et al.*, 2018; GAD EL-MOULA *et al.*, 2019). Essas pesquisas estão de acordo com outros relatos na literatura mostrando combinações de produtos naturais e antibióticos que podem reduzir a resistência a antibióticos (COUTINHO *et al.*, 2008).

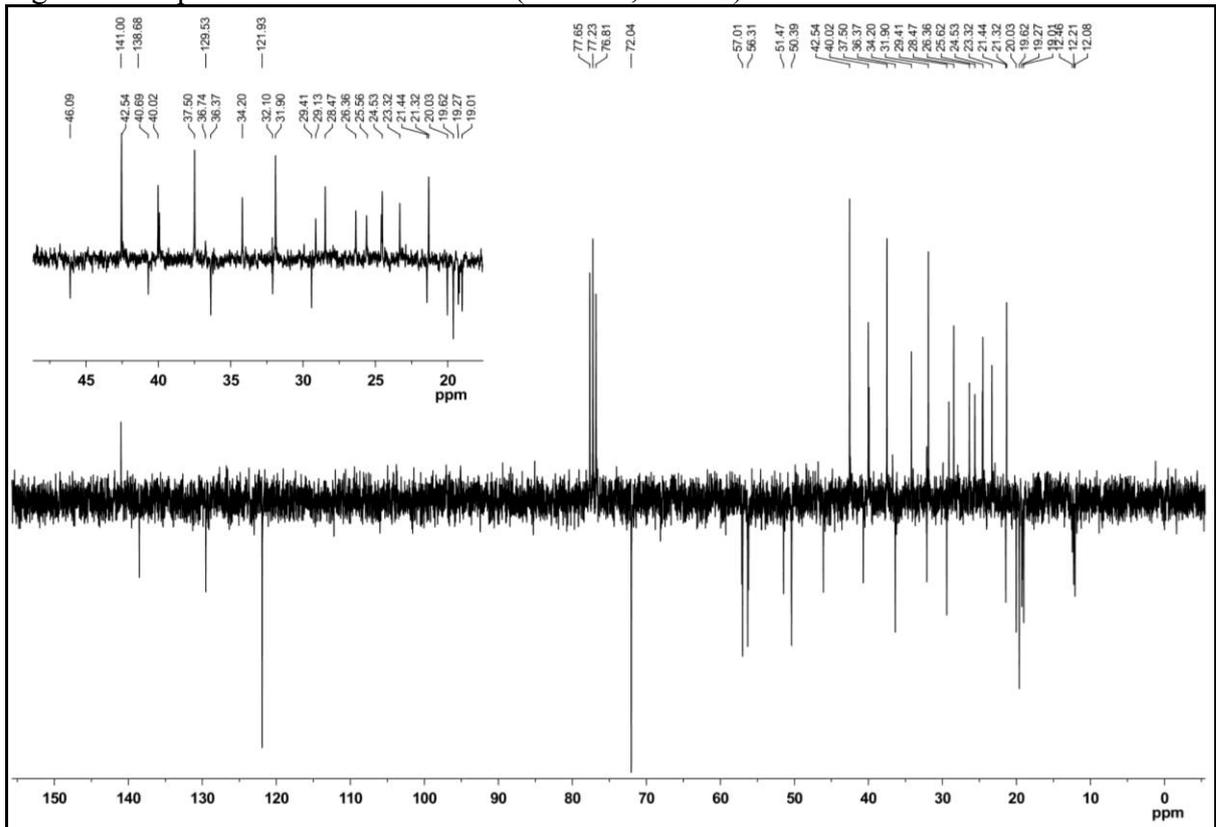
O espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3 , Figura 5) de **BPC-1** exibiu 35 linhas espectrais. O sinal em δ_{C} 72,03 foi relacionado ao carbono carbinólico C-3 e os sinais em δ_{C} 140,99 e 121,7 foram atribuídos aos carbonos C-5 e C-6, respectivamente. Vale salientar que os três sinais em δ_{C} 72,03, δ_{C} 121,7 e δ_{C} 140,99 são comuns aos dois esteroides. Enquanto os sinais em δ_{C} 138,53 e 129,52 foram atribuídos aos carbonos C-22 e C-23 do estigmasterol. A análise comparativa do espectro de RMN ^{13}C -BB com o espectro de RMN ^{13}C -APT (Figura 6, pág. 34) permitiu identificar o padrão de hidrogenação dos átomos de carbono das estruturas dos esteroides (Tabela 2, pág. 36).

Figura 5 – Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) de **BPC-1**



Fonte: o próprio autor.

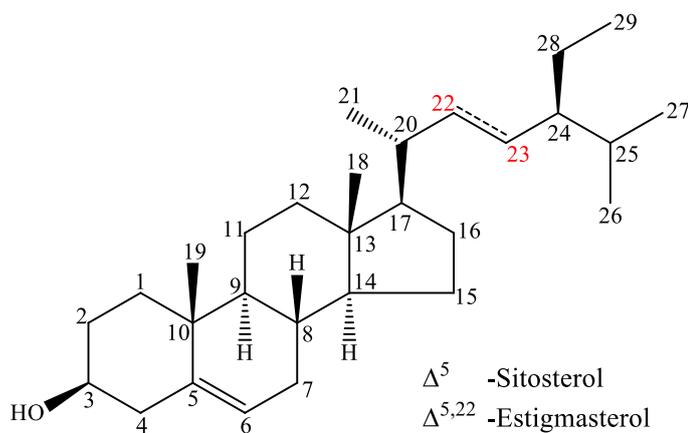
Figura 6 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (75 MHz, CDCl_3) de **BPC-1**



Fonte: o próprio autor.

A análise dos dados espectroscópicos e posterior comparação com dados descritos na literatura (SILVA *et al.*, 2012, Tabela 2, pág. 36), permitiram identificar **BPC-1** como a mistura de esteroides sitosterol, (**BPC-1a**) e estigmasterol (**BPC-1b**), cujas estruturas estão mostradas na Figura 7 (pág. 35). A mistura de sitosterol ($3\beta,20R,24R$)-estigmast-5-en-3-ol) e estigmasterol ($3\beta,20S,22E,24S$)-estigmaster-5,22-dien-3-ol) já foi isolada de outras espécies do gênero *Bauhinia*, tais como *B. strychnifolia* (YUENYONGSAWAD *et al.*, 2013), *B. purpurea* (JOSHI; DESAI; BHOBE, 2013), *B. pentandra* (ALMEIDA, 2015), *B. unguata* (SOUSA *et al.*, 2016) e *B. acuruana* (GÓIS *et al.*, 2017).

Figura 7 – Estruturas do sitosterol e estigmasterol



Fonte: o próprio autor.

As percentagens aproximadas dos dois constituintes (**BPC-1a** e **BPC-1b**) foram calculadas com base na integração dos sinais no espectro de RMN ^1H . A integração média dos átomos de hidrogênio H-22 e H-23, exclusivos do estigmasterol (**BPC-1b**) é 0,74. Enquanto, a integração de H-6, que está presente nas duas substâncias foi 2,00. Fazendo a diferença dos valores consegue-se obter a integração do hidrogênio do sitosterol (**BPC-1a**), sendo, portanto, 1,26. Dessa forma, pode-se calcular a porcentagem dos constituintes na mistura, obtendo-se assim 63,0% de sitosterol (**BPC-1a**) e 37,0% de estigmasterol (**BPC-1b**).

Tabela 2 – Dados espectroscópicos referentes a mistura*/** de **BPC-1a** (sitosterol*) e **BPC-1b** (estigmasterol**) comparados com os dados descritos na literatura (SILVA *et al.*, 2012)

	BPC-1a e BPC-1b (CDCl ₃)			Literatura (CDCl ₃)		
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., <i>J</i> Hz)		δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., <i>J</i> Hz)	
C				*	**	**
5	140,99			140,7		
10	36,74			36,5		
13	42,53			42,2		
CH						
3	72,03	3,53 (m)		71,8	3,57 (t; 7,0)*/**	
6	121,93	5,36 (s)		121,7	5,36 (d; 4,8)*/**	
8	32,14			31,9		
9	50,38			50,1		
14	57,00			56,7		
17	56,30			56,0		
20	36,37	40,69		36,1	40,5	
22	-	138,53	5,02 (dd; 15,1; 8,2)	-	138,3	5,0 (dd; 15,5; 8,7)**
23	-	129,52	5,16 (dd; 15,1; 8,4)	-	129,2	5,16 (dd; 15,5; 8,5)**
24	46,08	51,46		45,8	51,2	
25	29,40	32,14		29,1	31,8	
CH₂						
1	37,49			37,2		
2	31,89			31,6		
4	42,53			42,2		
7	31,89			31,9		
11	21,30			21,1		
12	40,01			39,8		
15	24,52			24,3		
16	28,46	29,13		28,2		
22	34,18	-		33,9	-	
23	26,34	-		26,0	-	
28	23,30	25,62		23,0	25,4	
CH₃						
18	12,08			11,8		
19	19,61			19,4		
21	19,00	21,43		18,8	21,1	
26	20,03	21,43		19,8	21,2	
27	19,26	19,20		19,3	18,9	
29	12,45	12,20		12,3	12,2	
3-OH	-	-		-	-	

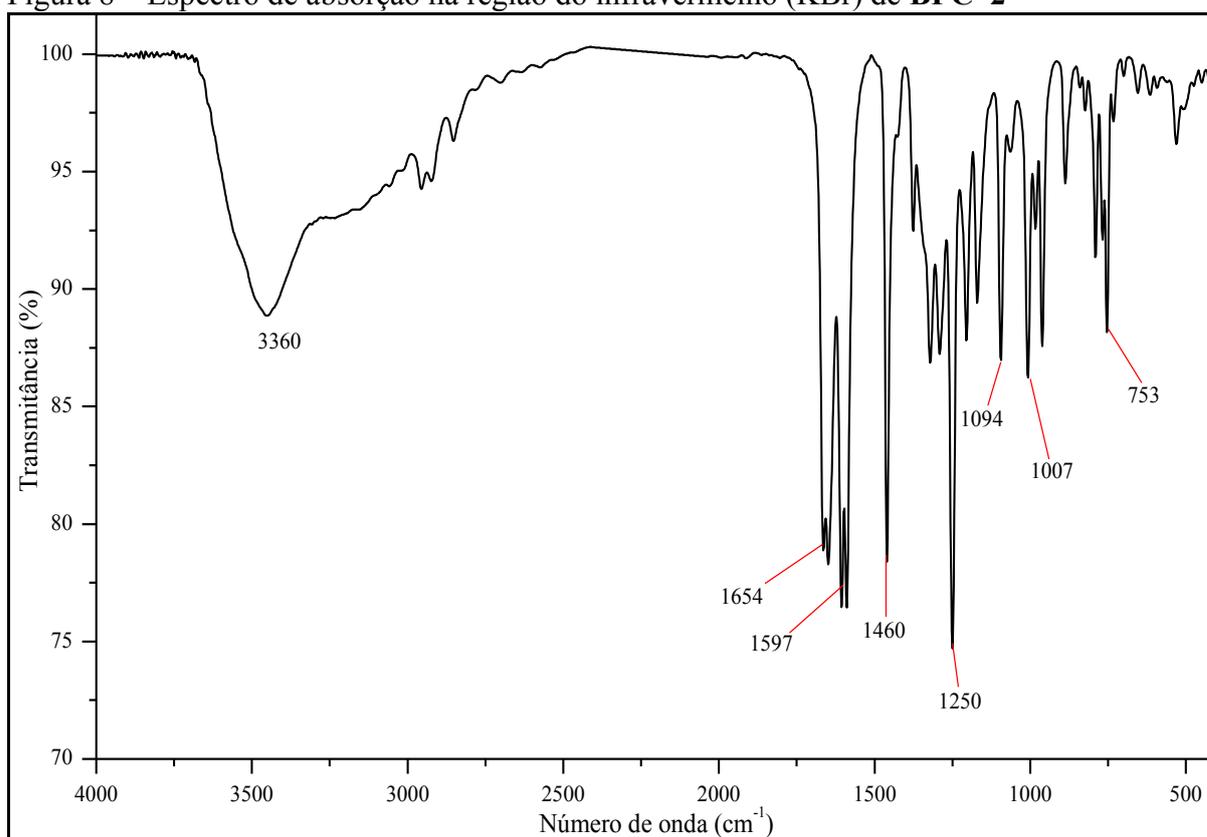
Fonte: o próprio autor.

5.1.2 Determinação estrutural de BPC-2

O fracionamento cromatográfico relatado no item 6.4.1.5, (pág. 118) resultou no isolamento de um sólido amorfo (3,7 mg) de cor preta, solúvel em metanol, com ponto de fusão na faixa de 178–179 °C, literatura: p.f. = 200–202 °C (PETTIT *et al.*, 2006), denominado **BPC-2**.

O espectro de absorção na região do infravermelho (IV) de **BPC-2** (Figura 8) exibiu uma banda larga centrada em 3360 cm^{-1} relacionada à deformação axial de ligação O–H; uma banda em 1654 cm^{-1} referente à deformação axial de ligação C=O conjugada; duas bandas associadas à deformação axial de ligação C=C, sendo uma em 1597 cm^{-1} e a outra em 1460 cm^{-1} , além de uma banda intensa em 1250 cm^{-1} característica de deformação axial de ligação C–O (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA *et al.*, 2015).

Figura 8 – Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de **BPC-2**

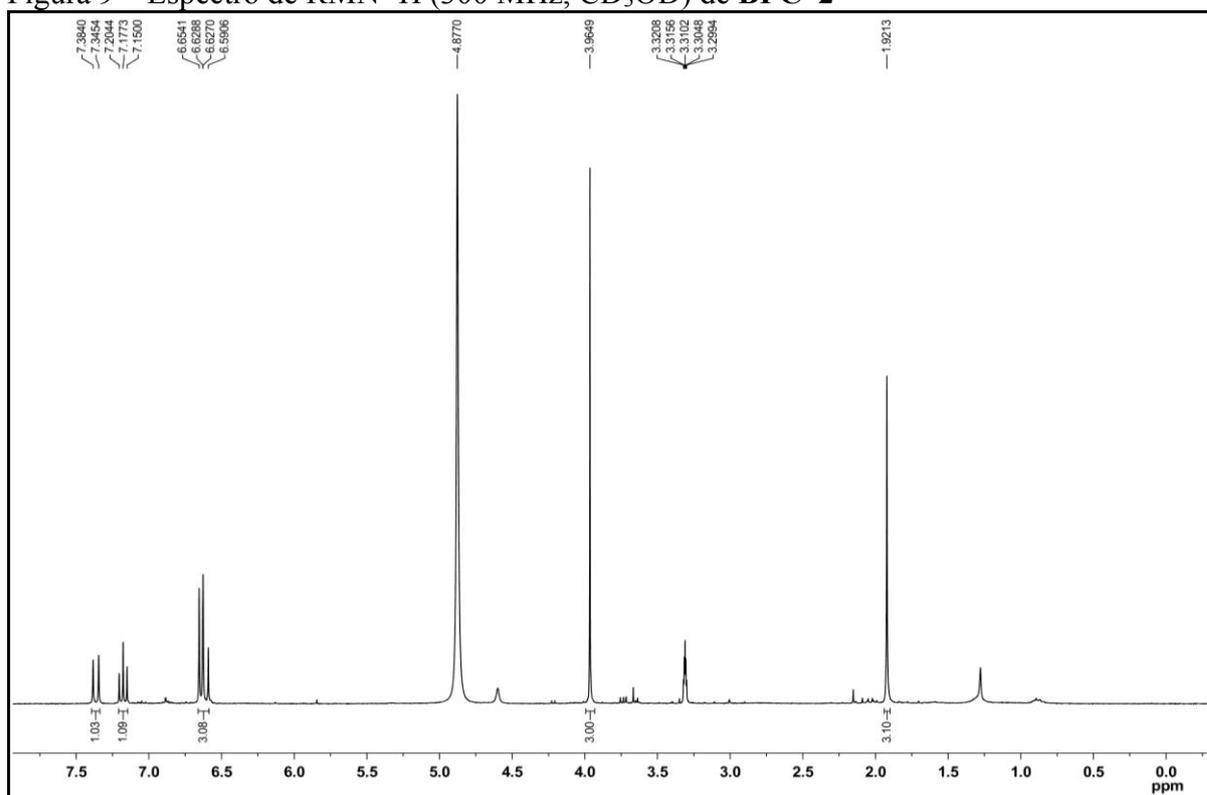


Fonte: o próprio autor.

O espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD , Figura 9, pág. 38) de **BPC-2** apresentou sinais na região entre δ_{H} 6,59–7,38, indicando a presença de hidrogênios ligados a carbonos insaturados. Observou-se dois dupletos, um em δ_{H} 7,36 (1H; d; $J = 11,6$ Hz) e o

outro em δ_H 6,61 (1H; d; $J = 11,6$ Hz), relacionados a hidrogênios ligados a carbonos de dupla ligação em configuração *cis*, devido à magnitude da constante de acoplamento. Além disso, foram observados sinais em δ_H 7,18 (1H; d; $J = 8,1$ Hz) e em δ_H 6,64 (2H; d; $J = 8,1$ Hz) sugerindo a presença de hidrogênios ligados a anel aromático em posicionamento *orto*. Adicionalmente, o espectro mostrou sinais em δ_H 3,96 (3H; s) e em δ_H 1,92 (3H; s) relacionados a hidrogênios de metoxila e metila, respectivamente.

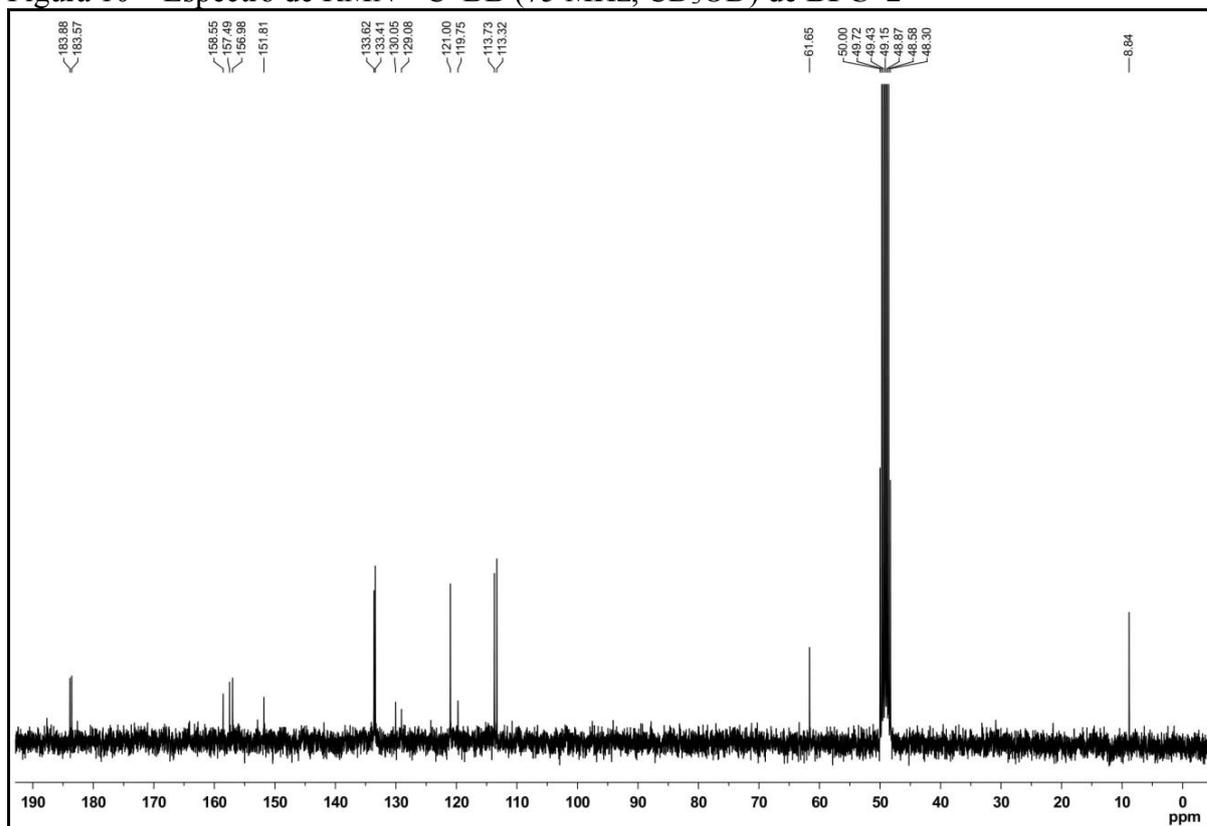
Figura 9 – Espectro de RMN 1H (300 MHz, CD_3OD) de **BPC-2**



Fonte: o próprio autor.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CD_3OD , Figura 10, pág. 39) de **BPC-2** mostrou 16 linhas espectrais. A análise desse espectro mostrou a presença de dois sinais atribuídos a carbonos de carbonila de cetona conjugada, sendo um em δ_C 183,57 e o outro em δ_C 183,88. Além disso, foram observados quatro sinais associados a carbonos sp^2 oxigenados em δ_C 158,55, δ_C 157,49, δ_C 156,98 e δ_C 151,81 (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA *et al.*, 2015).

Figura 10 – Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CD_3OD) de **BPC-2**

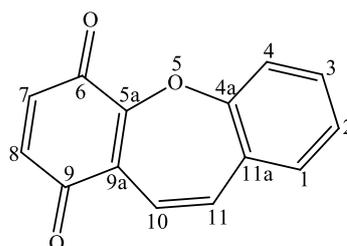


Fonte: o próprio autor.

Não foi possível obter os espectros de RMN ^{13}C -DEPT 135 e de ^{13}C x ^1H -HSQC, mas com a análise dos espectros de RMN ^1H , ^{13}C -BB e ^{13}C x ^1H -HMBC e posterior comparação com dados da literatura, foi possível construir a Tabela 3 (pág. 43).

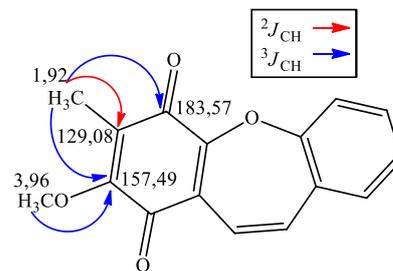
A análise dos dados espectroscópicos permitiu sugerir a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$, com índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a onze. Esta observação, portanto, permitiu deduzir que **BPC-2** trata-se de um derivado oxepínico, com a presença de um anel ciclo-hexadienona. A Figura 11 mostra o esqueleto básico de **BPC-2**.

Figura 11 – Esqueleto básico de **BPC-2**

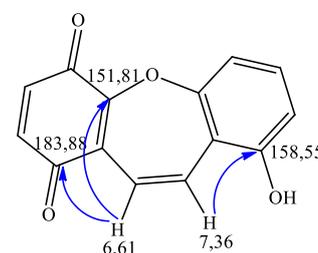


Fonte: o próprio autor.

As posições dos grupos metila, metoxila e hidroxila de estrutura de **BPC-2** foram determinadas através da análise dos dados do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$ -HMBC (Figura 12, pág. 41). Na ciclo-hexadienona, a posição da metila foi definida pelas correlações a duas ligações ($^2J_{\text{CH}}$) entre os hidrogênios em δ_{H} 1,92 e o carbono em δ_{C} 129,08 e a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) com os carbonos em δ_{C} 183,57 (C-6) e δ_{C} 157,49 (C-8). Já o posicionamento do grupo metoxila foi definido pela correlação a $^3J_{\text{CH}}$ dos hidrogênios em δ_{H} 3,96 com o carbono C-8 (δ_{C} 157,49).



A posição da hidroxila no anel aromático foi confirmada pela correlação a três ligações do hidrogênio em δ_{H} 7,36 (H-11) com o carbono C-1 (δ_{C} 158,55). A fixação de uma das carbonilas pode ser corroborada pela correlação do tipo $^3J_{\text{CH}}$ do hidrogênio em δ_{H} 6,61 (H-10) com o carbono C-9 (δ_{C} 183,88). Além disso, foi observada a correlação a $^3J_{\text{CH}}$ do hidrogênio H-10 com o carbono em δ_{C} 151,81 (C-5a).



Adicionalmente, foram observadas as correlações dos hidrogênios no anel aromático. O hidrogênio em δ_{H} 6,64 está se correlacionando a duas ligações de distância ao carbono oxigenado em δ_{C} 158,55 (C-1) e a três ligações com o carbono C-4 (δ_{C} 132,32). H-3 (δ_{H} 7,18) correlaciona-se a $^3J_{\text{CH}}$ com o carbono em δ_{C} 156,98 (C-4a). Por fim, H-4 (δ_{H} 6,64) correlaciona-se a três ligações de distância com o carbono C-11a (δ_{C} 119,75).

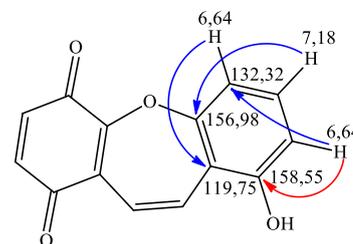
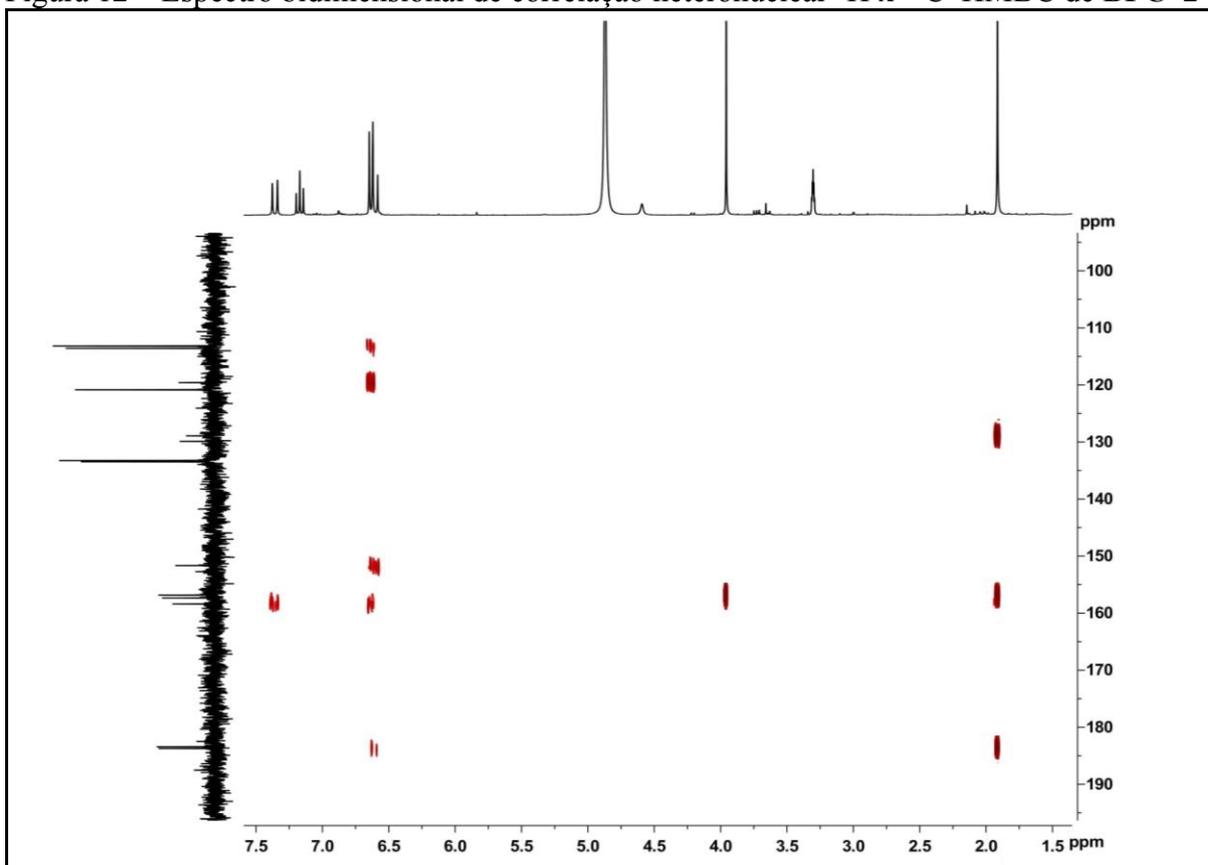


Figura 12 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de **BPC-2**



Fonte: o próprio autor.

O espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de **BPC-2** (Figura 13, pág. 42) apresentou a correlação dos hidrogênios em δ_{H} 7,36 (H-11) e em δ_{H} 6,60 (H-10), enfatizando suas configurações relativas *cis*. O espectro mostrou ainda, os acoplamentos envolvendo os hidrogênios em δ_{H} 6,64 (H-4 e/ou H-2) e em δ_{H} 7,18 (H-3), confirmando o posicionamento *orto* no anel aromático.

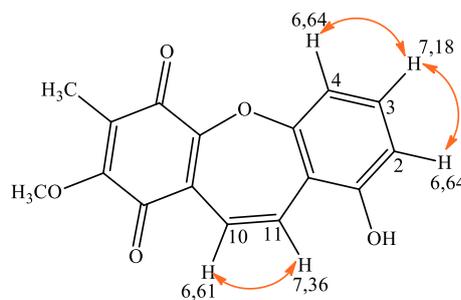
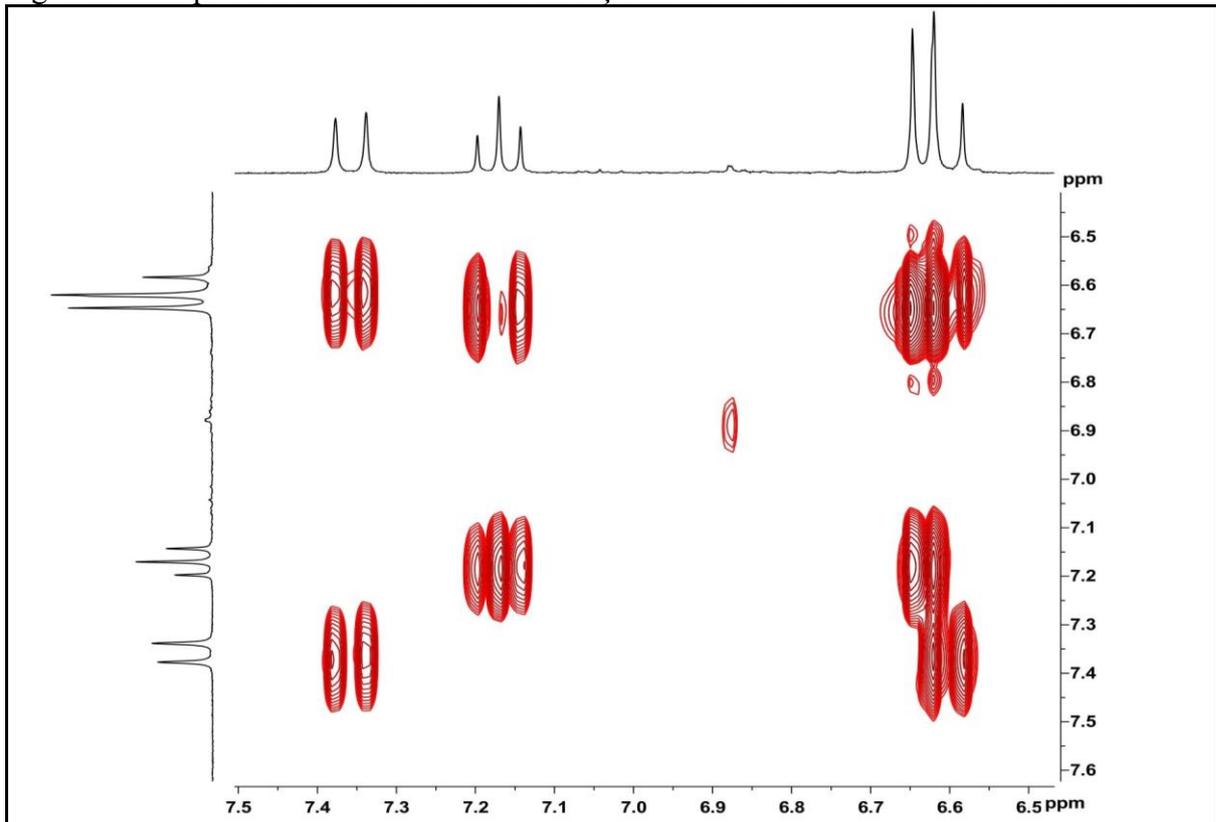


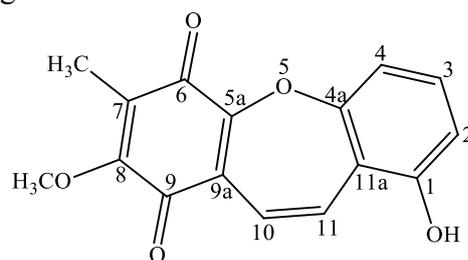
Figura 13 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de **BPC-2**



Fonte: o próprio autor.

Os dados espectrais apresentados e posterior comparação com dados descritos na literatura (PETTIT *et al.*, 2006, Tabela 3, pág. 43) permitiram identificar **BPC-2** como sendo da classe das oxepinas denominada 1-hidróxi-7-metil-8-metóxi-benzo[*b,f*]oxepina-6,9-diona, conhecida vulgarmente como bauginiastatina 1 (Figura 14). Vale resaltar que essa substância já foi isolada de *B. purpurea* (PETTIT *et al.*, 2006), *B. acuruana* (GÓIS *et al.*, 2017) e *B. cheilantha* (SILVA, 2018) e que está sendo isolada pela primeira vez em *B. pentandra*. Há relatos na literatura da atividade antineoplásica dessa substância sobre as linhagens de células tumorais humanas P388 (leucemia linfocítica), com significativa inibição do crescimento (PETTIT *et al.*, 2006).

Figura 14 – Estrutura da bauginiastatina 1



Fonte: o próprio autor.

Tabela 3 – Dados espectroscópicos de RMN de **BPC-2** comparados com os dados descritos na literatura (PETTIT *et al.*, 2006) para a baehiniastatina 1

	BPC-2 (CD ₃ OD)		HMBC		Literatura (CDCl ₃)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., <i>J</i> Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., <i>J</i> Hz)
C						
1	158,55	-	H-2	H-11	157,1	-
4a	156,98	-		H-3	153,8	-
5a	151,81	-		H-10	150,6	-
6	183,57	-		H ₃ C-7	182,0	-
7	129,08	-	H ₃ C-7		128,4	-
8	157,49	-		H ₃ C-7; H ₃ CO-8	155,4	-
9	183,88	-		H-10	182,5	-
9a	130,05	-			128,6	-
11a	119,75	-		H-4	118,5	-
CH						
2	113,73	6,64 (d; 8,1)			114,1	6,85 (dd; 8,3; 0,9)
3	133,62	7,18 (t; 8,1)			132,2	7,22 (t; 8,3)
4	113,32	6,64 (d; 8,1)		H-2	112,8	6,63 (dd; 8,3; 0,9)
10	121,00	6,61 (d; 11,6)			121,1	6,74 (d; 11,7)
11	133,41	7,36 (d; 11,6)			131,7	7,37 (d; 11,7)
CH₃						
H ₃ C-7	8,84	1,92 (s)			8,8	1,98 (s)
H ₃ CO-8	61,65	3,96 (s)			61,1	3,99 (s)
1-OH	-	-			-	-

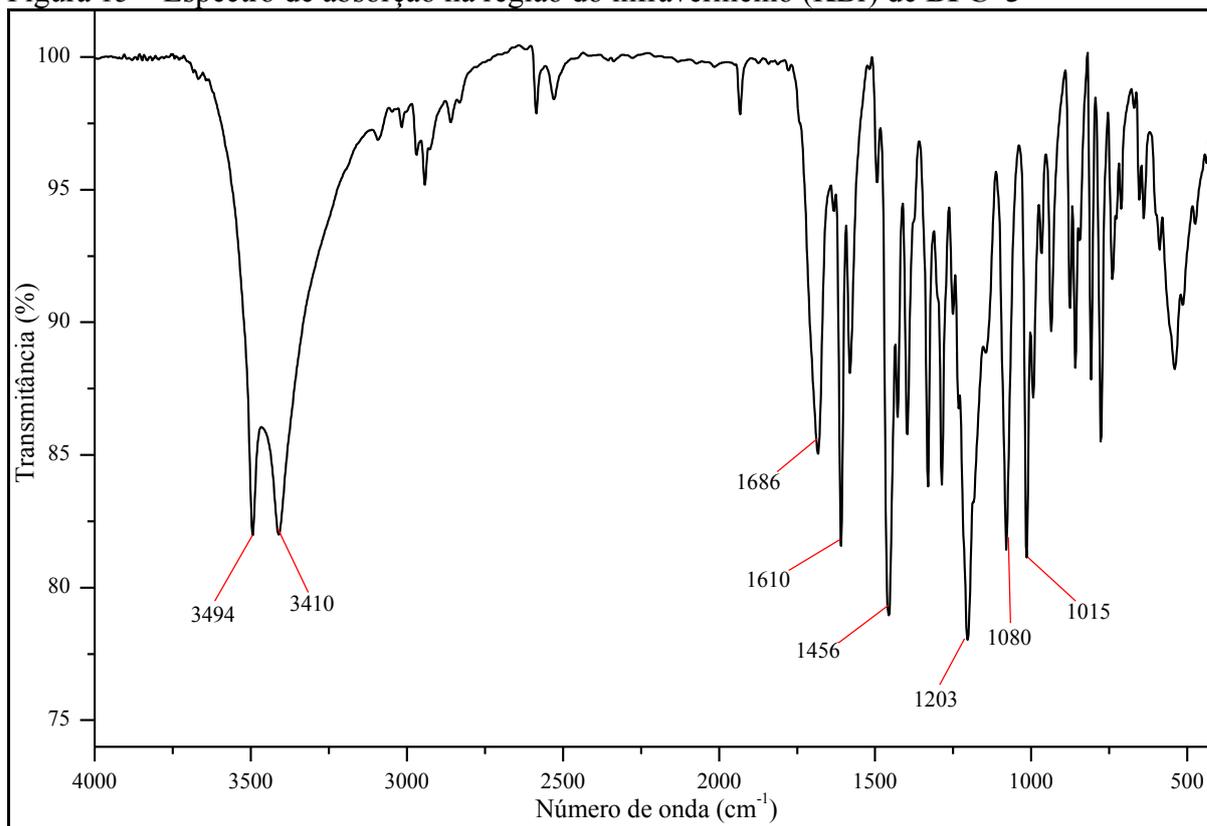
Fonte: o próprio autor.

5.1.3 Determinação estrutural de BPC-3

A metodologia descrita no item 6.4.1.8 (pág. 120) resultou no isolamento de um sólido amorfo de cor branca (11,5 mg) solúvel em metanol, com ponto de fusão na faixa de 202–203 °C, literatura: p.f. = 196–198 °C (PETTIT *et al.*, 2006), que foi denominado **BPC-3**.

O espectro de absorção na região do infravermelho (IV) de **BPC-3** (Figura 15) mostrou duas bandas de absorção relacionadas à deformação axial de ligação O–H, uma em 3410 cm^{-1} e a outra em 3494 cm^{-1} ; duas bandas de absorção referentes à deformação axial de ligação C=C em 1686 cm^{-1} e em 1610 cm^{-1} ; além de uma banda de absorção em 1456 cm^{-1} de deformação axial C=C em anéis aromáticos. Adicionalmente, o espectro revelou bandas de absorção em 1080 cm^{-1} e 1203 cm^{-1} características de deformação axial de ligação C–O (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA *et al.*, 2015).

Figura 15 – Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de **BPC-3**

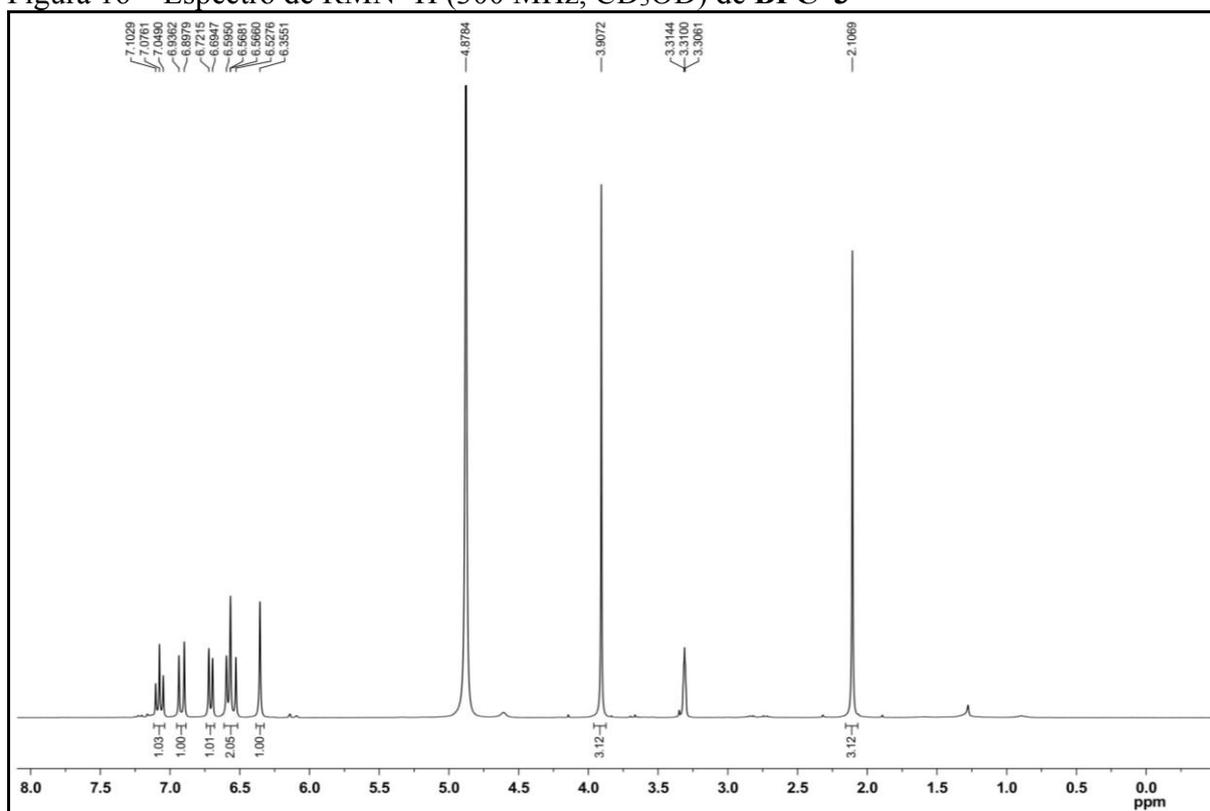


Fonte: o próprio autor.

O espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD , Figura 16, pág. 45) de **BPC-3** mostrou sinais na região entre δ_{H} 6,34–7,10, confirmando a presença de hidrogênios ligados a carbonos insaturados. Foram observados dois dupletos, um em δ_{H} 6,92 (1H; d; $J = 11,5$ Hz) e outro em δ_{H} 6,55 (1H; d; $J = 11,5$ Hz), característicos de hidrogênios ligados a carbonos de

dupla ligação em configuração *cis*. Além disso, o espectro exibiu um sinal em 6,35 (1H; s) correspondente a hidrogênio ligado a anel aromático pentassubstituído. Observou-se também, sinais relacionados a hidrogênios ligados a carbonos de anéis aromáticos *orto* posicionados, em δ_H 7,08 (1H; t; $J = 8,1$ Hz), δ_H 6,71 (1H; d; $J = 8,1$ Hz) e em δ_H 6,58 (1H; d; $J = 8,1$ Hz). Adicionalmente, os sinais em δ_H 3,91 (3H; s) e δ_H 2,11 (3H; s) foram atribuídos aos hidrogênios de grupos metoxila e metila, respectivamente (PAVIA *et al.*, 2015).

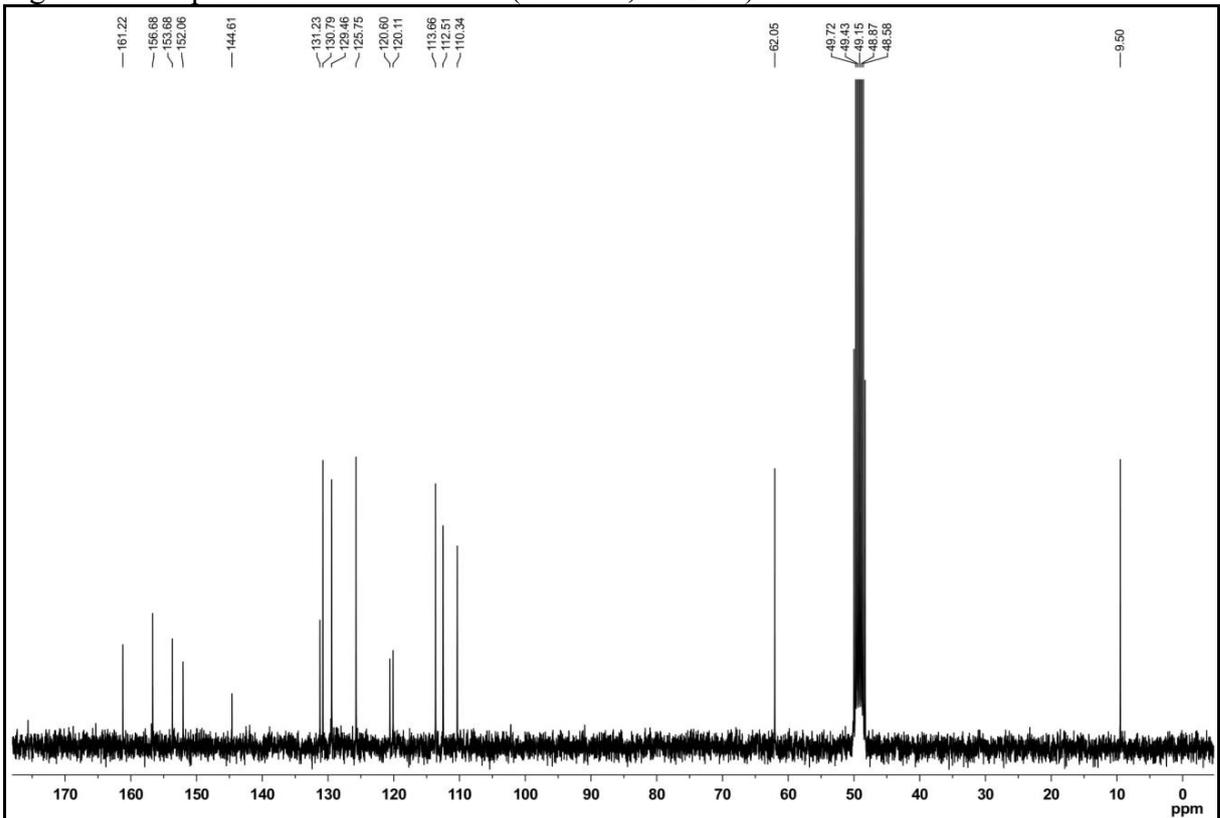
Figura 16 – Espectro de RMN 1H (300 MHz, CD_3OD) de **BPC-3**



Fonte: o próprio autor.

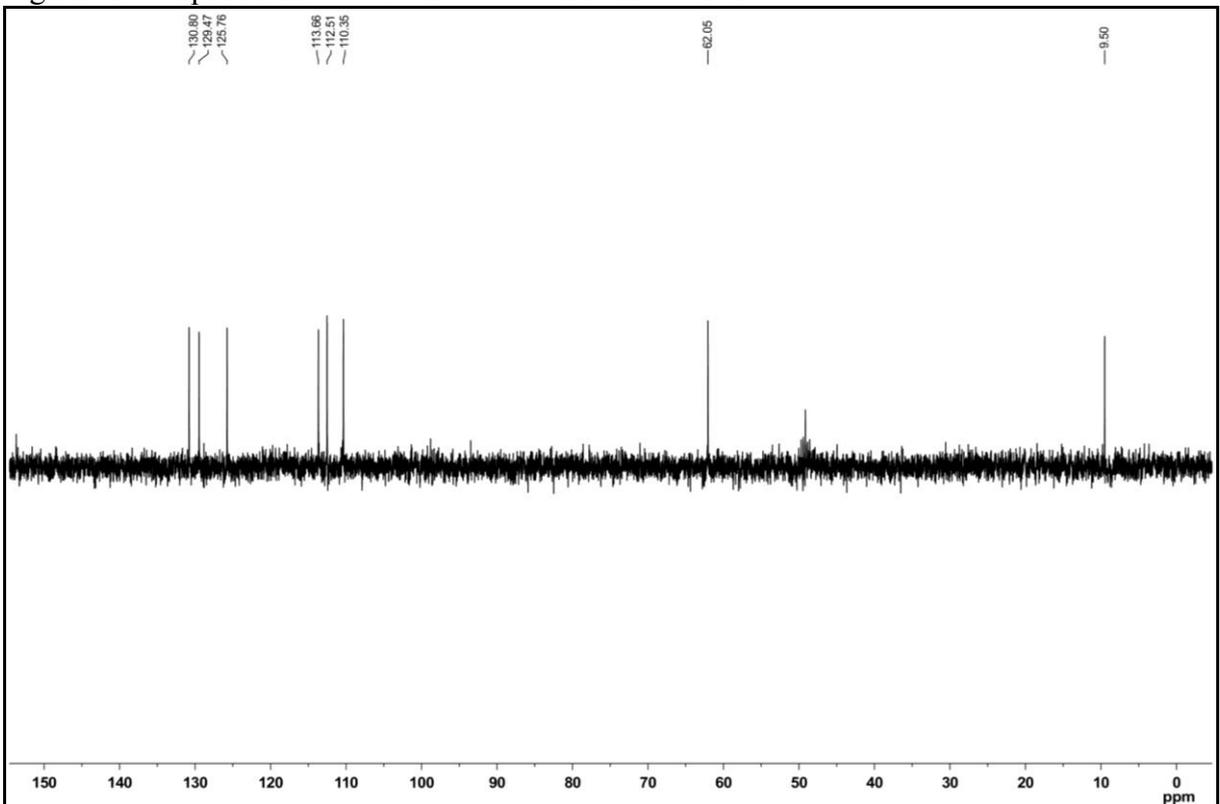
A análise do espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CD_3OD , Figura 17, pág. 46) de **BPC-3** mostrou a presença de 16 linhas espectrais, sendo cinco sinais mais desprotegidos em δ_C 161,22, δ_C 156,68, δ_C 152,06, δ_C 144,61 e δ_C 153,68, associados a carbonos sp^2 oxigenados (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA *et al.*, 2015). A comparação dos espectros de RMN ^{13}C -BB e ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CD_3OD , Figura 18, pág. 46) possibilitou identificar o padrão de hidrogenação dos átomos de carbono, sendo oito sinais para carbonos desidrogenados (C), seis absorções correspondentes a carbonos metínicos (CH) e dois sinais referentes a carbonos metílicos (CH_3) (Tabela 4, pág. 51).

Figura 17 – Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CD_3OD) de **BPC-3**



Fonte: o próprio autor.

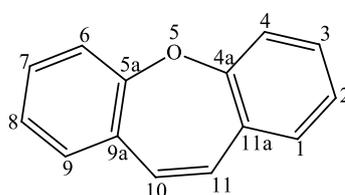
Figura 18 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de **BPC-3**



Fonte: o próprio autor.

Através da reunião dos dados espectroscópicos, sugeriu-se a fórmula molecular de **BPC-3**, $C_{16}H_{14}O_4$, com índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a dez, compatível com o esqueleto de um derivado dibenzo[*b,f*]oxepínico (Figura 19), classe de metabólitos secundários de ocorrência rara na natureza (PETTIT *et al.*, 2006), no entanto, já isolados de algumas espécies do gênero *Bauhinia* (ANJANEYULU *et al.*, 1984; PETTIT *et al.*, 2006; BOONPHONG *et al.*, 2007; GÓIS *et al.*, 2017; TANJUNG; SAPUTRI; TIAHJANDARIE, 2014) e de *Cercis chinensis* (MU *et al.*, 2007).

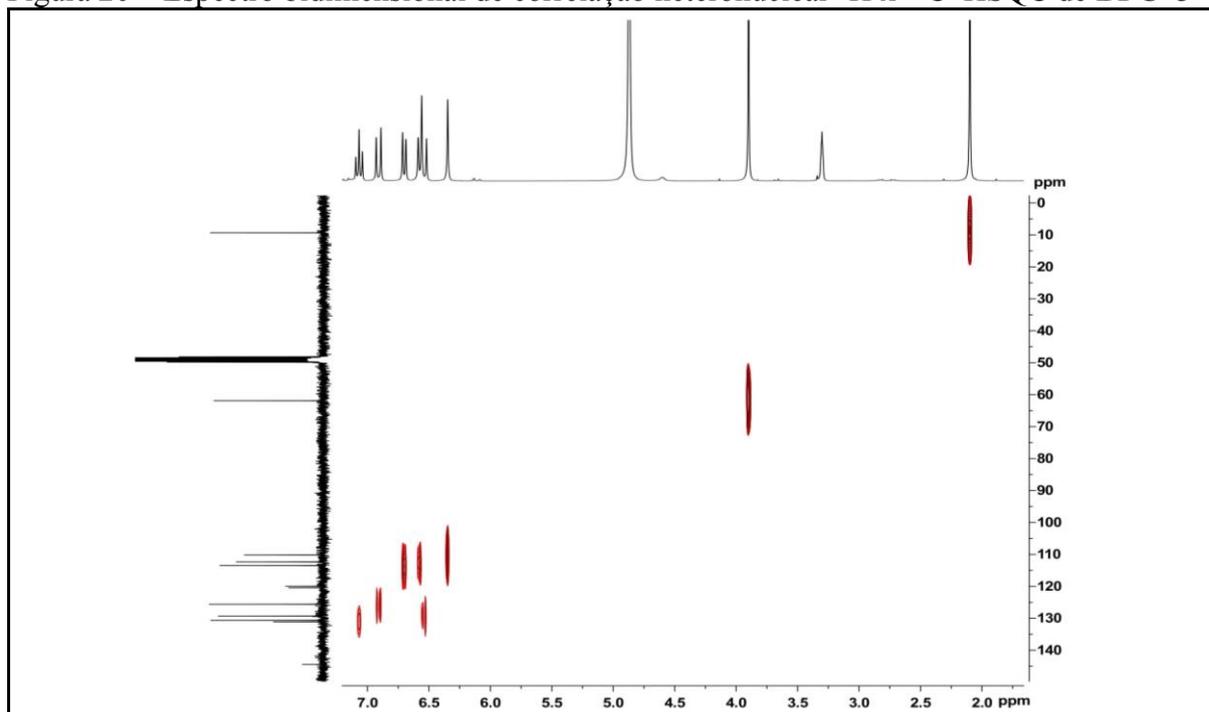
Figura 19 – Esqueleto básico de derivado dibenzo[*b,f*]oxepínico



Fonte: o próprio autor.

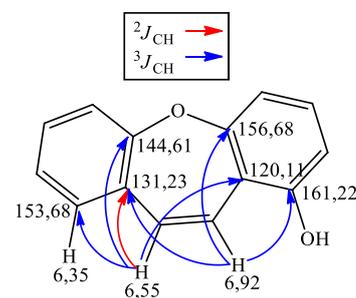
A análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1H \times ^{13}C$ -HSQC (Figura 20) possibilitou a associação direta entre todos os sinais de hidrogênios aos seus respectivos átomos de carbonos, como mostrado na Tabela 4 (pág. 51).

Figura 20 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1H \times ^{13}C$ -HSQC de **BPC-3**



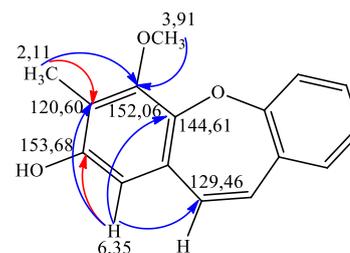
Fonte: o próprio autor.

Através da análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^{13}C x ^1H -HMBC de **BPC-3** (Figura 21, pág. 49 e Figura 22, pág. 49) foi possível atribuir as posições dos substituintes ligados ao esqueleto do derivado dibenzo[*b,f*]oxepínico. A posição de uma das hidroxilas no anel aromático foi fixada através da correlação a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) do hidrogênio em δ_{H} 6,92 (H-11) com o carbono C-1 (δ_{C} 161,22). Esse hidrogênio também mostrou correlações a três ligações com os carbonos C-4a (δ_{C} 156,68) e C-9a (δ_{C} 131,23).



Já o hidrogênio em δ_{H} 6,55 (H-10) correlacionou a $^3J_{\text{CH}}$ com os carbonos C-9 (δ_{C} 153,68), C-5a (δ_{C} 144,61) e C-11a (δ_{C} 120,11) e a $^2J_{\text{CH}}$ com o carbono C-9a (δ_{C} 131,23).

A localização da metoxila foi definida através da correlação a três ligações entre o sinal em δ_{H} 3,91 (3H-6) e o carbono em δ_{C} 152,06 (C-6). Por outro lado, a posição da metila foi confirmada através das correlações a duas e a três ligações entre os hidrogênios em δ_{H} 2,11 (3H-7) com os átomos de carbono em δ_{C} 120,60 (C-7) e δ_{C} 152,06 (C-6), respectivamente. O posicionamento da hidroxila foi determinado com base na correlação a duas ligações do hidrogênio em δ_{H} 6,35 (1H-9) com o carbono em δ_{C} 153,68 (C-8). Adicionalmente, esse hidrogênio correlacionou-se a três ligações com os carbonos em δ_{C} 120,60 (C-7), δ_{C} 144,61 (C-5a) e δ_{C} 129,46 (C-10), confirmando seu posicionamento.



A posição do hidrogênio em δ_{H} 7,08 (1H-3) foi definida pelas correlações a três ligações com os carbonos em δ_{C} 156,68 (C-4a) e δ_{C} 161,22 (C-1). Por outro lado, a fixação do hidrogênio em δ_{H} 6,71 (1H-2) foi possível através da correlação a duas ligações com o carbono em δ_{C} 161,22 (C-1). Esse mesmo hidrogênio apresenta correlação a três ligações com os carbonos em δ_{C} 112,52 (C-4) e δ_{C} 120,11 (C-11a). Por fim, as correlações a três ligações do hidrogênio em δ_{H} 6,58 (1H-4) com os carbonos em δ_{C} 120,11 (C-11a) e δ_{C} 113,66 (C-2), corrobora a sua posição.

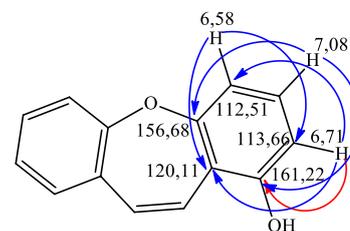
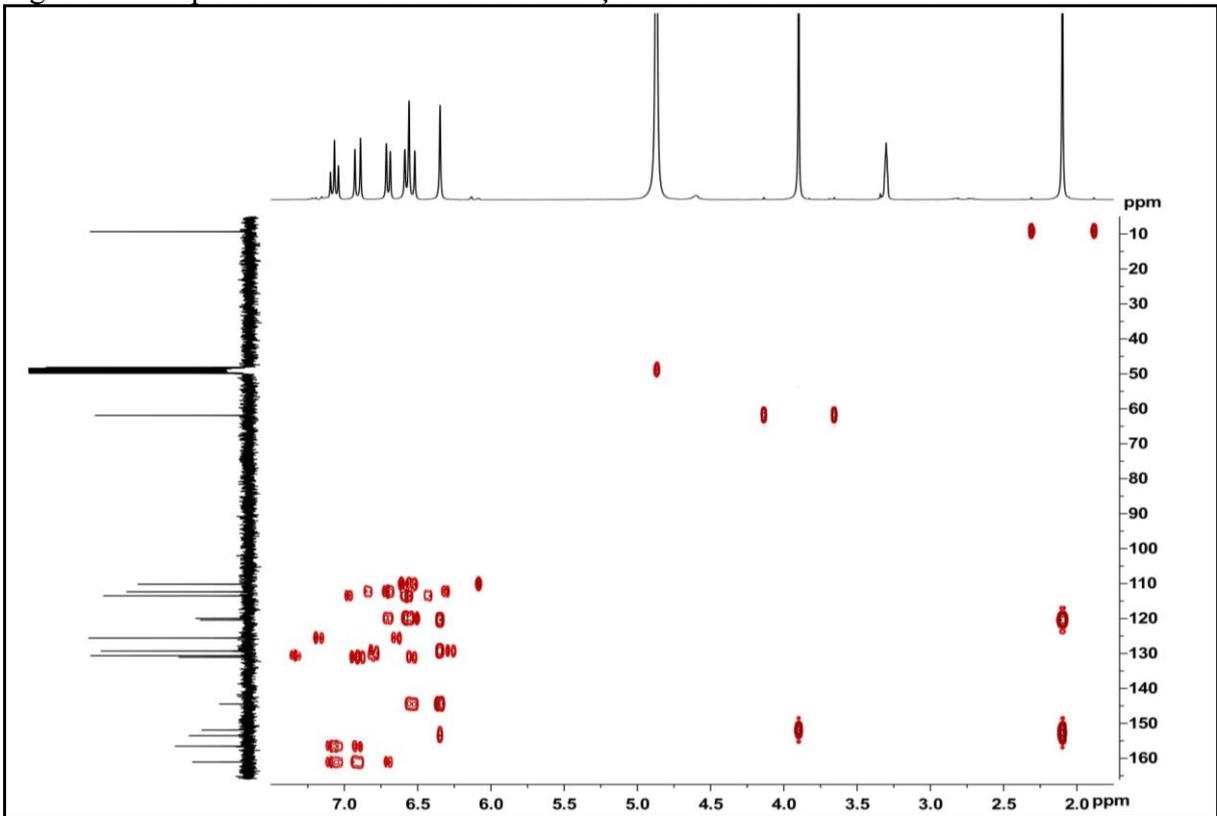
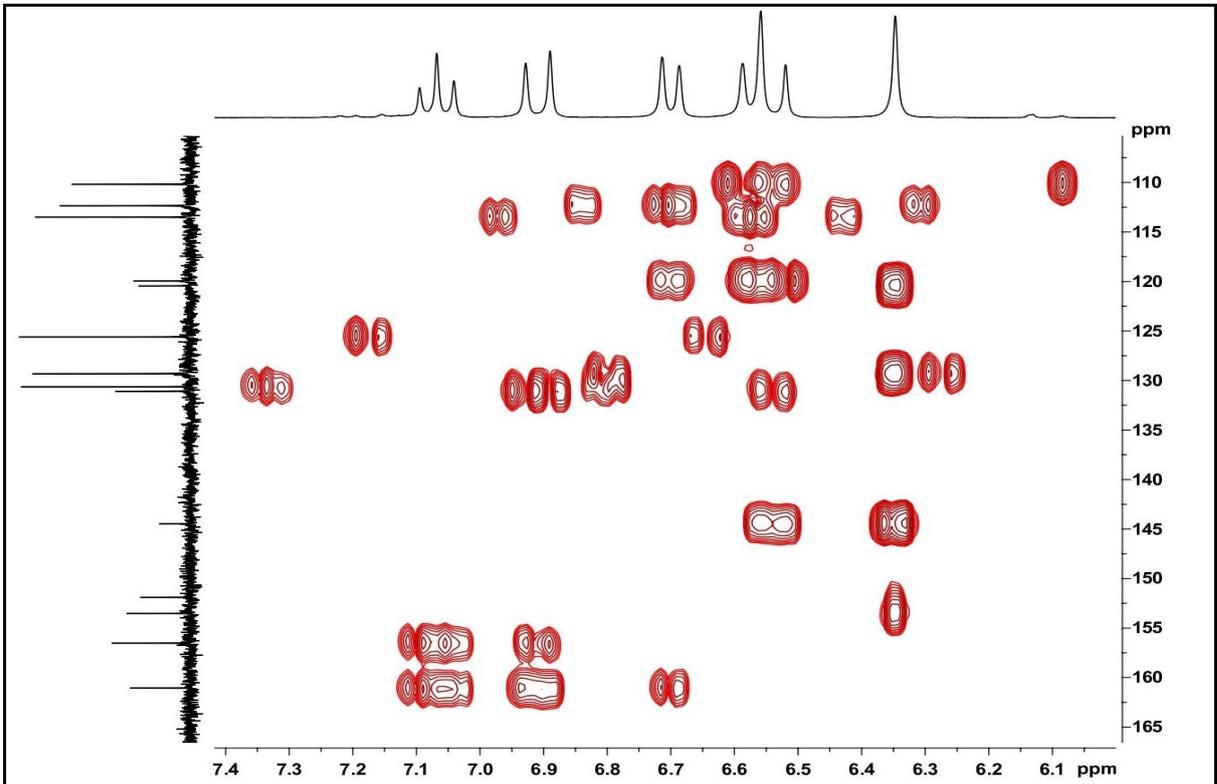


Figura 21 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de **BPC-3**



Fonte: o próprio autor.

Figura 22– Expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de **BPC-3**



Fonte: o próprio autor.

A análise do espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de **BPC-3** (Figura 23) permitiu observar a correlação entre os hidrogênios em δ_{H} 6,92 (H-11) e δ_{H} 6,55 (H-10). O espectro mostrou também as correlações do hidrogênio em δ_{H} 7,07 (H-3) com δ_{H} 6,71 (H-2) e δ_{H} 6,58 (H-4), confirmando os acoplamentos entre os hidrogênios dos respectivos sistemas propostos.

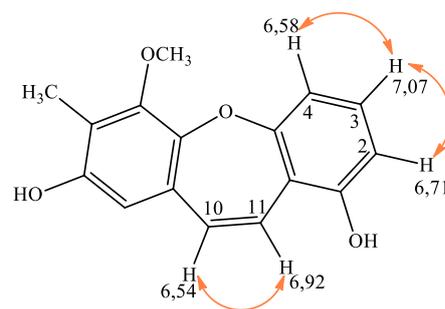
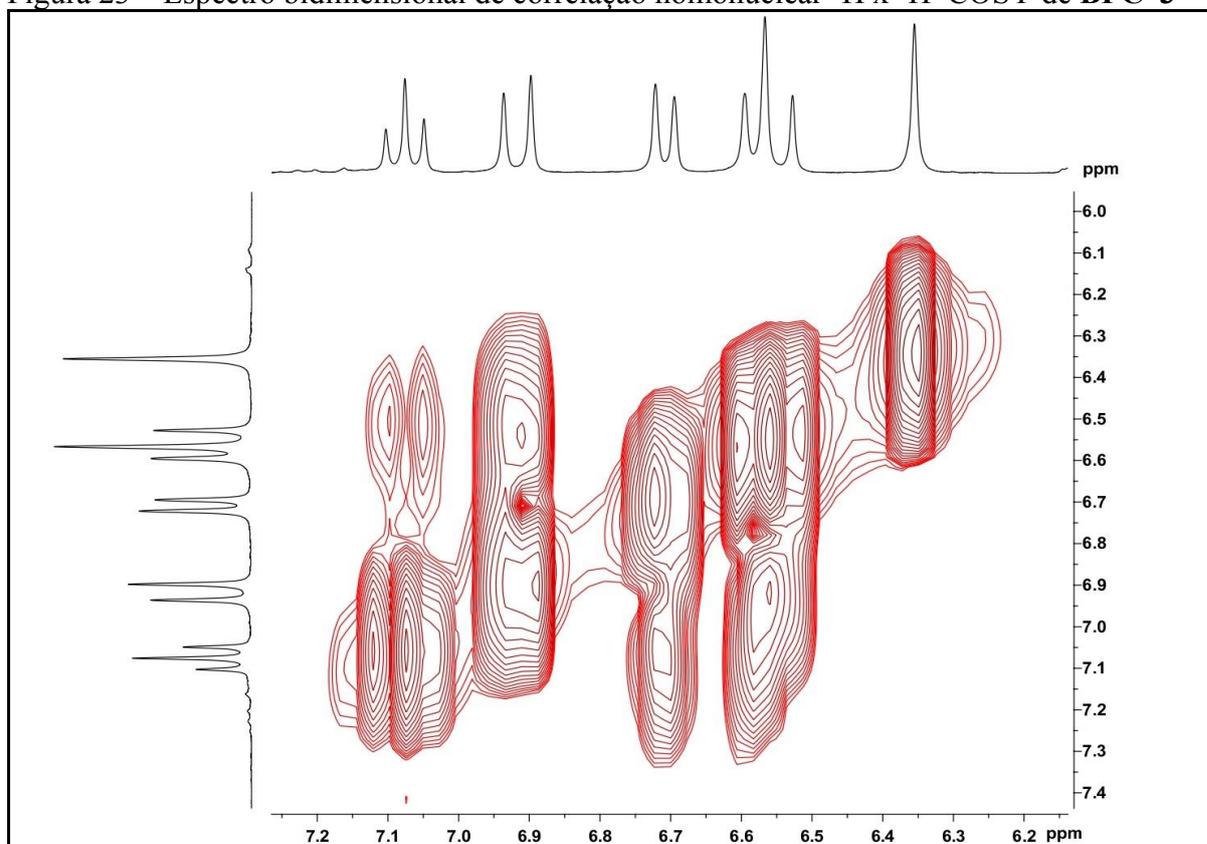


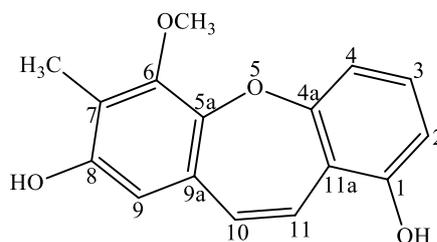
Figura 23 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de **BPC-3**



Fonte: o próprio autor.

Através da análise dos dados espectroscópicos obtidos, além da comparação com dados registrados na literatura (PETTIT *et al.*, 2006, Tabela 4, pág. 51) foi possível identificar **BPC-3** como uma substância da classe das oxepinas denominada 1,8-didróxi-7-metil-6-metóxi-dibenzo[*b,f*]oxepina, conhecida vulgarmente como bauhiniastatina 4 (Figura 24, pág. 51). Essa oxepina já foi isolada de espécies do gênero *Bauhinia*, tais como *B. aculeata* (TANJUNG; SAPUTRI; TJAHJANDARIE, 2014) e *B. purpúrea* (PETTIT *et al.*, 2006). Vale destacar que substância está sendo relatada pela primeira vez em *B. pentandra*.

Figura 24 – Estrutura da bauhiniastatina 4



Fonte: o próprio autor.

Tabela 4 – Dados espectroscópicos de RMN de **BPC-3** comparados com os dados descritos na literatura (PETTIT *et al.*, 2006) para a bauhiniastatina 4

C	BPC-3 (CD ₃ OD)		HMBC		Literatura (CDCl ₃)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., JHz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., JHz)
C						
1	161,22	-	H-2	H-3; H-11	159,8	-
4a	156,68	-		H-3; H-11	153,2	-
5a	144,61	-		H-9; H-10	144,3	-
6	152,06	-		H ₃ CO-6; H ₃ C-7	150,9	-
7	120,60	-	H ₃ C-7	H-9	119,2	-
8	153,68	-	H-9		150,7	-
9a	131,23	-	H-10	H-11	129,7	-
11a	120,11	-		H-2; H-4; H-10	118,6	-
CH						
2	113,66	6,71 (d; 8,1)		H-4	114,2	6,89 (dd; 8,2; 0,9)
3	130,79	7,08 (t; 8,1)			129,9	7,13 (t; 8,2)
4	112,51	6,58 (d; 8,1)		H-2	111,7	6,56 (dd; 8,2; 0,9)
9	110,34	6,35 (s)		H-10	109,4	6,38 (s)
10	129,46	6,55 (d; 11,5)		H-9	129,4	6,68 (d; 11,7)
11	125,75	6,92 (d; 11,5)			123,7	6,93 (d; 11,7)
CH₃						
H ₃ CO-6	62,05	3,91 (s)			61,6	3,99 (s)
H ₃ C-7	9,50	2,11 (s)			9,0	2,17 (s)
1-OH	-	-			-	-
8-OH	-	-			-	-

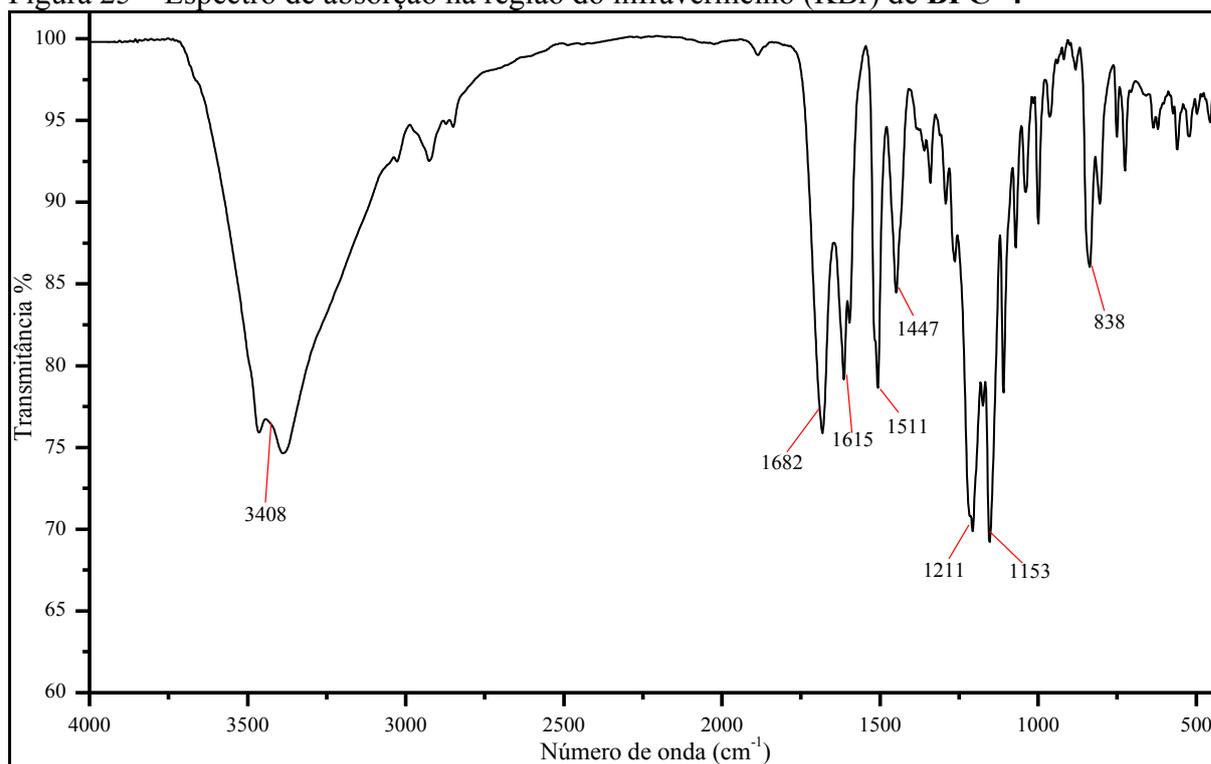
Fonte: o próprio autor.

5.1.4 Determinação estrutural de BPC-4

O tratamento cromatográfico resultou, conforme metodologia descrita no item 6.4.1.11 (pág. 122), no isolamento de um sólido amorfo de cor branca (6,3 mg), solúvel em metanol, com ponto de fusão na faixa de 185–186 °C, literatura: p.f. = 202–203 °C (LAN *et al.*, 2006), que foi denominado **BPC-4**.

O espectro de absorção na região do infravermelho (IV) de **BPC-4** (Figura 25) mostrou uma banda centrada em 3408 cm^{-1} correspondente à deformação axial de ligação O–H; quatro bandas características de deformação axial de ligação C=C de anel aromático em 1682, 1615, 1511 e 1447 cm^{-1} ; duas bandas relacionadas à deformação axial de ligação C–O, uma em 1211 cm^{-1} e a outra em 1153 cm^{-1} (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA *et al.*, 2015).

Figura 25 – Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de **BPC-4**

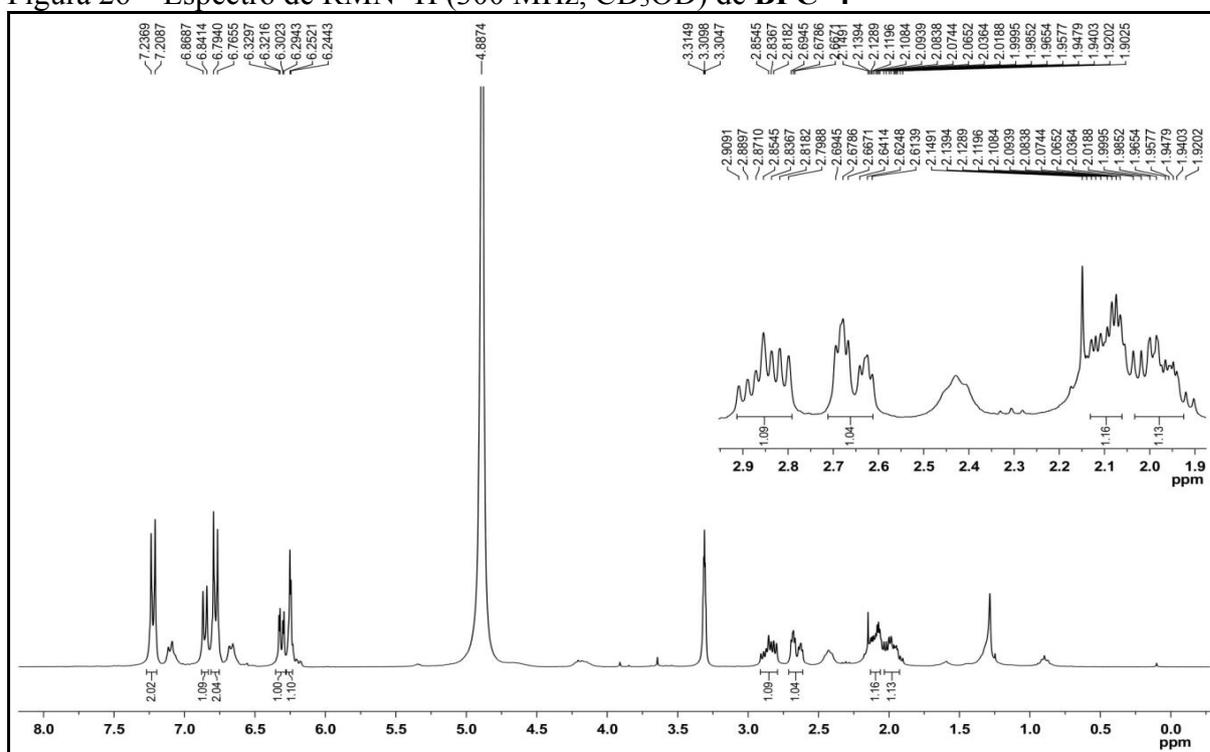


Fonte: o próprio autor.

A análise do espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD , Figura 26, pág. 53) de **BPC-4** possibilitou a identificação de sinais na região entre δ_{H} 6,24–7,23, indicando a presença de hidrogênios ligados a carbonos de anel aromático. Os sinais em forma de dupletos, juntamente com suas constantes de acoplamento em δ_{H} 7,22 (2H; d; $J = 8,5$ Hz), δ_{H} 6,85 (1H; d; $J = 8,2$ Hz) e δ_{H} 6,78 (2H; d; $J = 8,5$ Hz) indicam a presença de hidrogênios *ortho*

posicionados. Além disso, o sinal em δ_H 6,31 (1H; dd; $J = 8,2$ e $2,4$ Hz) sugeriu a presença de hidrogênio em posições *orto* e *meta*, respectivamente. Enquanto que o sinal em δ_H 6,25 (1H; d; $J = 2,3$ Hz) está relacionado a hidrogênio em posição *meta*. Adicionalmente, os sinais em δ_H 2,11 e 1,97 (2H; m) e δ_H 2,85 e 2,65 (2H; m) sugerem a presença de hidrogênios ligados a carbonos metilênicos. Vale ressaltar que o espectro contém um sinal sobreposto pelo sinal da água em δ_H 4,88, que foi evidenciado pelas correlações dos espectros bidimensionais HSQC, HMBC e COSY. Esse sinal em δ_H 4,80 (1H; dd; $J = 9,90$ e $1,65$) é característico de hidrogênio ligado a carbono oxigenado (Tabela 5, pág. 59).

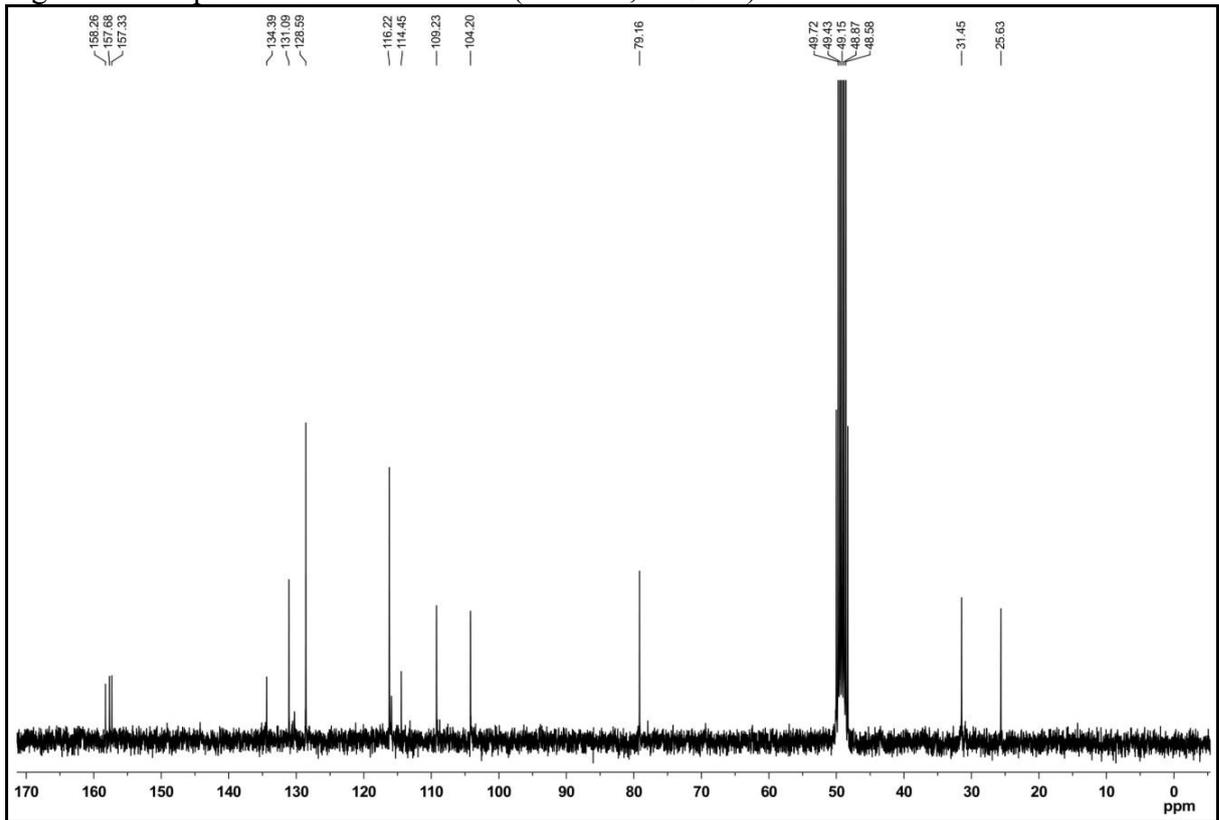
Figura 26 – Espectro de RMN 1H (300 MHz, CD_3OD) de **BPC-4**



Fonte: o próprio autor.

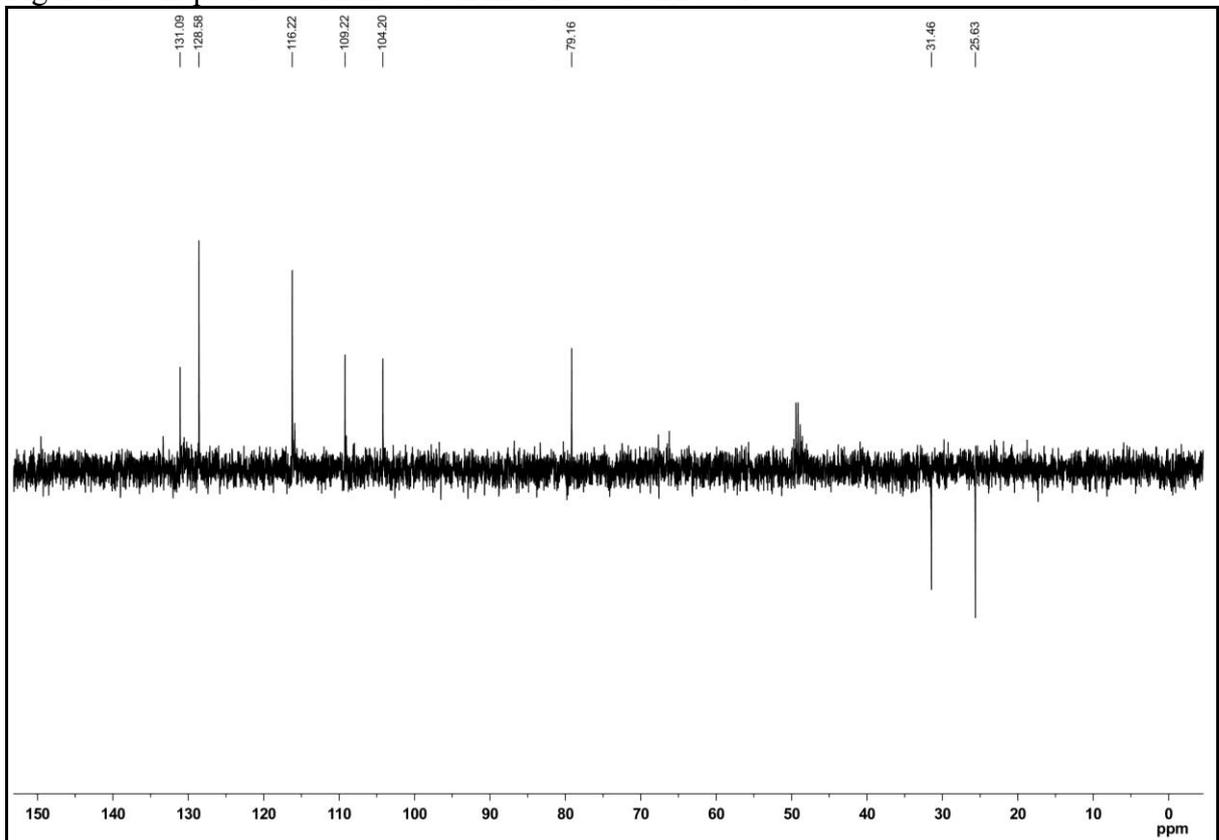
O espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CD_3OD , Figura 27, pág. 54) de **BPC-4** revelou a presença de 13 linhas espectrais, dos quais, três sinais mais desprotegidos em δ_C 158,26, δ_C 157,68 e δ_C 157,33 são relacionados a carbonos sp^2 oxigenados. A análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C -BB e ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CD_3OD , Figura 28, pág. 54) permitiu identificar o padrão de hidrogenação dos átomos de carbono, sendo cinco sinais relacionados a carbonos desidrogenados (C), oito carbonos metínicos (CH) e dois sinais compatíveis com carbonos metilênicos (CH_2). Vale ressaltar que os sinais em δ_C 128,59 e δ_C 116,22 foram atribuídos a dois átomos de carbonos cada, devido às suas intensidades quando comparados com os demais de mesmo padrão de hidrogenação (Tabela 5, pág. 59).

Figura 27 – Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CD_3OD) de **BPC-4**



Fonte: o próprio autor.

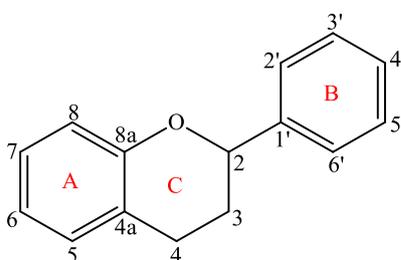
Figura 28 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de **BPC-4**



Fonte: o próprio autor.

A observação dos dados espectroscópicos de **BPC-4** permitiu deduzir a fórmula molecular $C_{15}H_{14}O_3$, com índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a nove, sugerindo, portanto, a presença de um esqueleto flavonoídico na estrutura deste composto. Vale ressaltar que a ausência de sinal para carbono de carbonila e a existência de um sinal referente a carbono oximetínico em δ_C 79,16 (C-2), bem como, dois sinais relativos a carbonos metilênicos em δ_C 31,45 (C-3) e δ_C 25,63 (C-4), observados no espectro de RMN ^{13}C -BB e de RMN ^{13}C -DEPT 135°, foram importantes para definir a classificação de **BPC-4**, como um flavonoide da classe das flavanas (AGRAWAL, 1989), cujo esqueleto básico está mostrado na Figura 29.

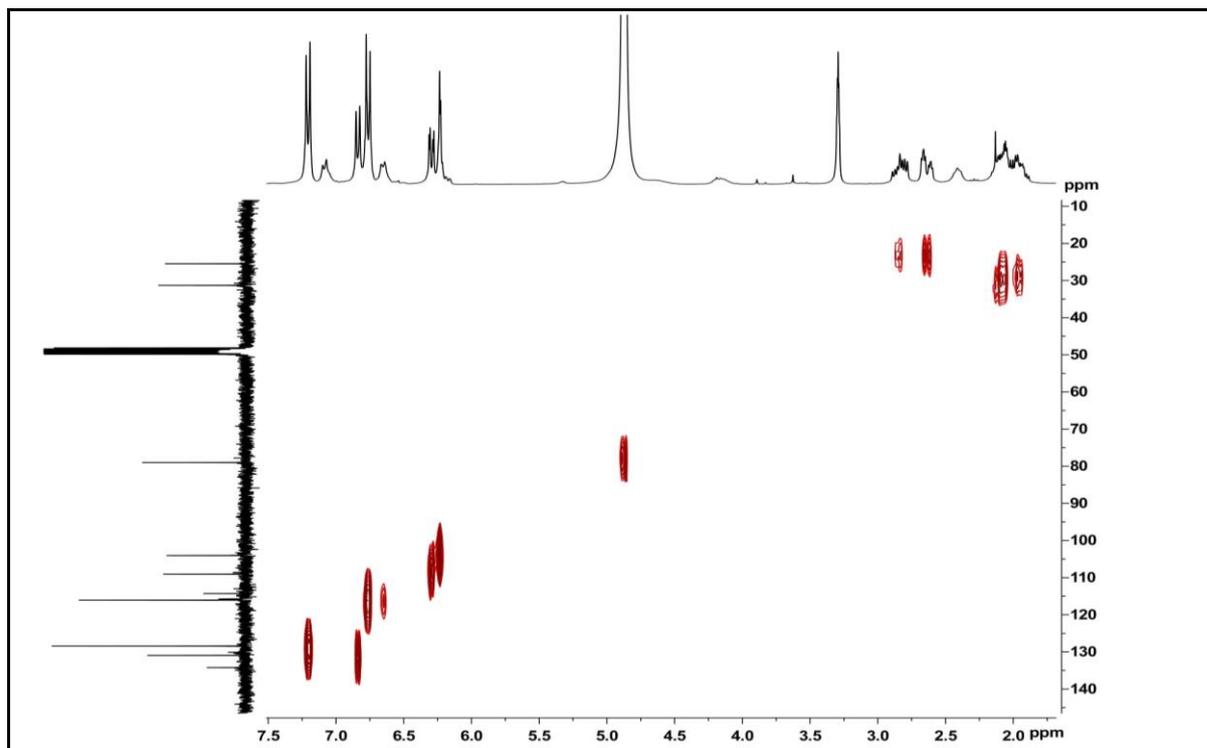
Figura 29 – Esqueleto básico de uma flavana



Fonte: o próprio autor.

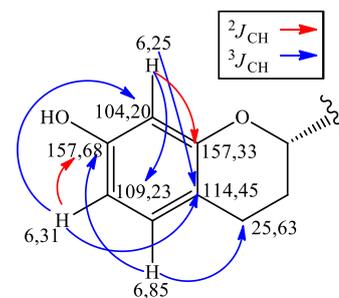
O espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1H \times ^{13}C$ -HSQC (Figura 30, pág. 56) permitiu a associação direta entre os sinais de hidrogênios aos seus respectivos átomos de carbonos, conforme mostrado na Tabela 5 (pág. 59).

Figura 30 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HSQC de **BPC-4**

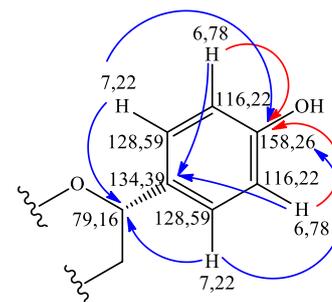


Fonte: o próprio autor.

No espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$ -HMBC de **BPC-4** (Figura 31, pág. 57) foi possível definir a localização da hidroxila no anel A através das correlações a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) do hidrogênio em δ_{H} 6,85 (H-5) com os carbonos em δ_{C} 25,63 (C-4) e δ_{C} 157,68 (C-7); correlações a $^3J_{\text{CH}}$ do hidrogênio em δ_{H} 6,31 (H-6) com os carbonos em δ_{C} 114,45 (C-4a) e δ_{C} 104,20 (C-8) e a duas ligações com o carbono C-7 (δ_{C} 157,68). Adicionalmente, observou-se as correlações a $^3J_{\text{CH}}$ do hidrogênio em δ_{H} 6,25 (H-8) com os carbonos em δ_{C} 114,45 (C-4a) e δ_{C} 109,23 (C-6) e a $^2J_{\text{CH}}$ do referido hidrogênio com o carbono C-8a (δ_{C} 157,33).



A posição da hidroxila no anel B foi confirmada por meio das correlações a três ligações dos hidrogênios em δ_{H} 7,22 (H-2'/6') com os carbonos em δ_{C} 158,26 (C-4') e δ_{C} 134,39 (C-2). Além disso, os hidrogênios em δ_{H} 6,78 (H-3'/5') correlacionaram a $^3J_{\text{CH}}$ com o carbono C-1' (δ_{C} 134,39) e a $^2J_{\text{CH}}$ com o carbono C-4' (δ_{C} 158,26), confirmando a posição dos desses hidrogênios, bem como a presença de um sistema *para* substituído no anel B.



Adicionalmente, foram observadas as correlações dos hidrogênios do anel C. O hidrogênio em δ_H 4,88 (H-2) correlacionou a três ligações com os carbonos em δ_C 128,59 (C-2'/6'). A correlação a $^2J_{CH}$ do hidrogênio em δ_H 2,85 (H-4) com o carbono C-3 (δ_C 31,45) e a $^3J_{CH}$ dos hidrogênios em δ_H 2,85/2,65 (H-4) com o carbono em δ_C 157,33 (C-8a) foram importantes para fixar a posição desses hidrogênios. Além disso, esses hidrogênios correlacionaram a $^3J_{CH}$ com o carbono em δ_C 79,16 (C-2) e a $^2J_{CH}$ com o carbono C-4a (δ_C 114,45).

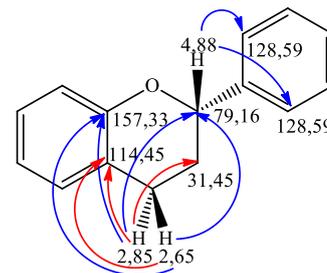
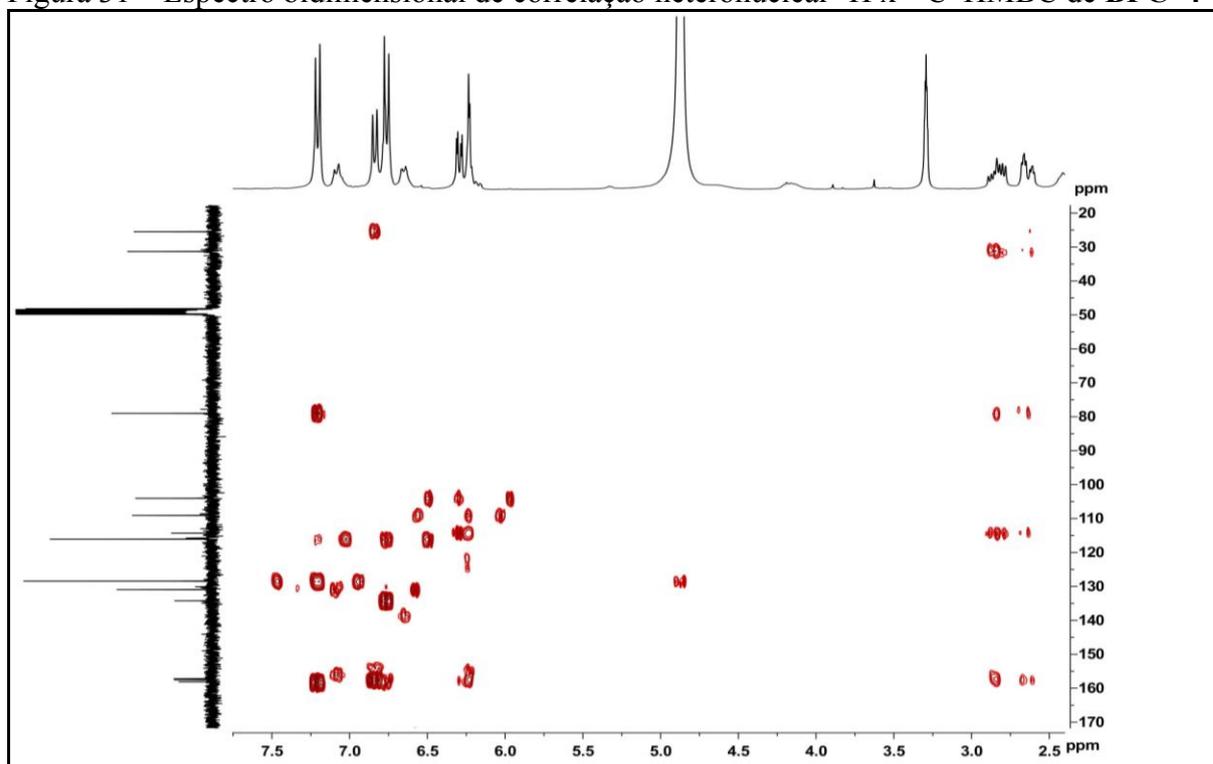


Figura 31 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1H \times ^{13}C$ -HMBC de **BPC-4**



Fonte: o próprio autor.

A análise do espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1H \times ^1H$ -COSY (Figura 32, pág. 58) de **BPC-4** revelou as correlações entre os hidrogênios em posições *orto* em δ_H 7,22 (H-2'/6') e δ_H 6,68 (H-3'/5') e entre δ_H 6,85 (H-5) e δ_H 6,31 (H-6). O espectro mostrou também as correlações entre os hidrogênios em δ_H 4,88 (H-2) e δ_H 1,97 (H-3); δ_H 2,11 (H-3) e δ_H 2,85 (H-4); δ_H 1,97 (H-3) e δ_H 2,65 (H-4). Essas correlações ajudaram a confirmar os respectivos sistemas propostos.

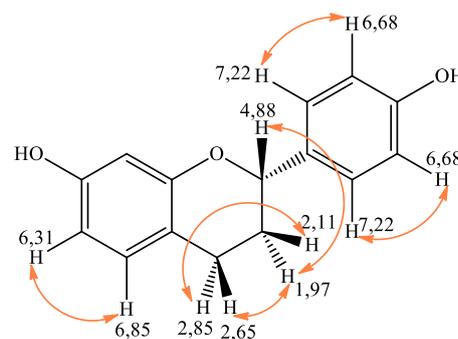
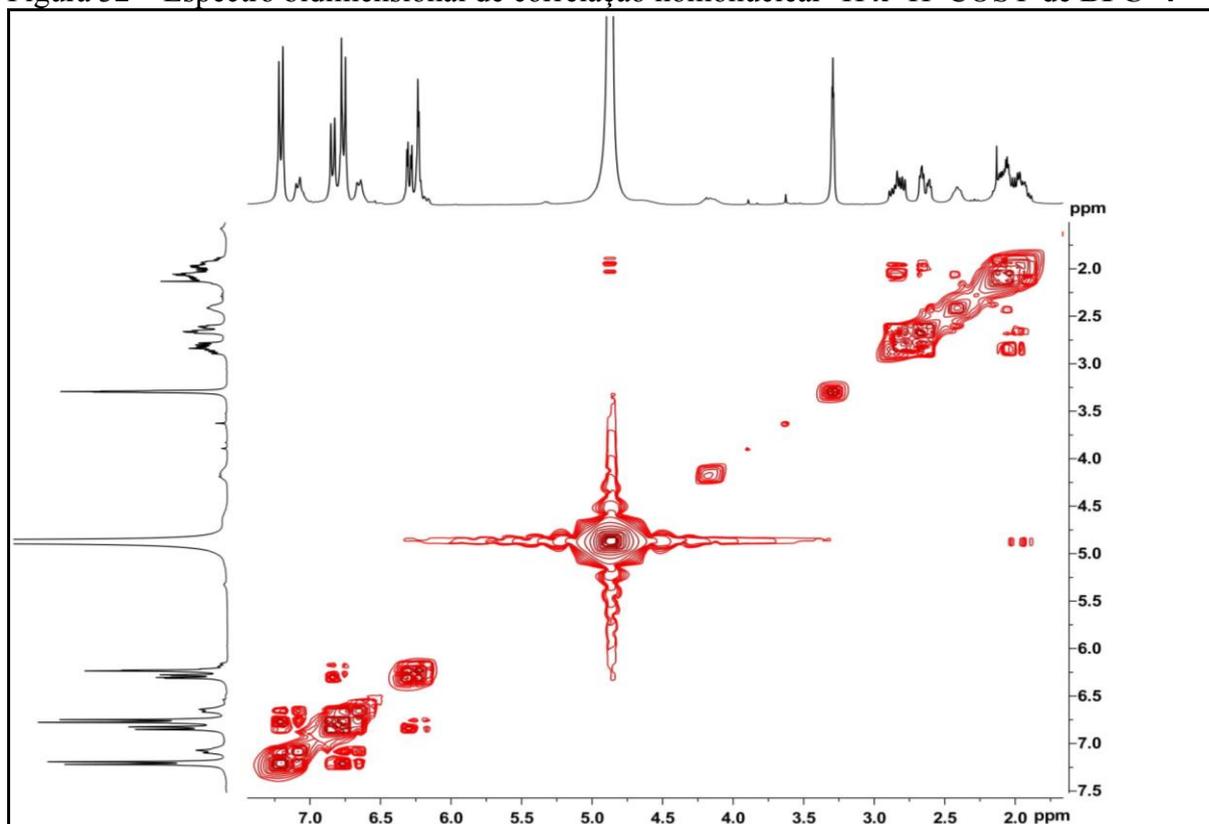


Figura 32 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de **BPC-4**

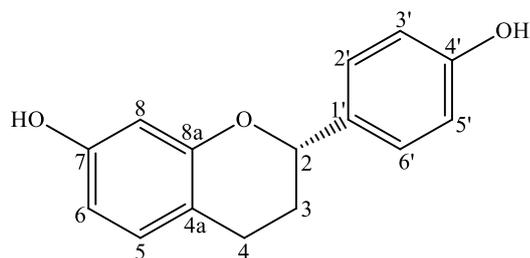


Fonte: o próprio autor.

Os valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios H-3 (δ_{H} 2,11/1,97) e H-4 (δ_{H} 2,85/2,65) estão condizentes com os dados relatados na literatura (XUE *et al.*, 2003). Por outro lado, é possível que os valores dos deslocamentos desses hidrogênios descritos na literatura (ZHENG; ZHANG; YANG, 2006; Tabela 5, pág. 59) estejam trocados.

A análise dos dados espectroscópicos obtidos (Tabela 5, pág. 59) e a posterior comparação com dados descritos na literatura (ZHENG; ZHANG; YANG, 2006) permitiram identificar **BPC-4** como um flavonoide da classe das flavanas denominado 7,4'-diidroxiflavana, cuja estrutura está mostrada na Figura 33 (pág. 59). Vale ressaltar que devido ao fato da estrutura conter um centro estereogênico (C-2), é necessária a obtenção de dados referentes à sua rotação óptica específica para posterior comparação com dados registrados na literatura, a fim de definir a sua configuração absoluta. Há relatos na literatura do isolamento da 7,4'-diidroxiflavana de *Bauhinia manca* (ACHENBACH; STOCKER; CONSTENLA, 1988). Vale ressaltar que o esse flavonoide está sendo relatado pela primeira vez na espécie *B. pentandra*. Estudos revelaram que esse composto exibe atividade citotóxica (AWALE *et al.*, 2009) e também atividade antifúngica (ACHENBACH; STOCKER; CONSTENLA, 1988).

Figura 33 – Estrutura da 7,4'-diidroxiflavana



Fonte: o próprio autor.

Tabela 5 – Dados espectroscópicos de **BPC-4** comparados com os dados descritos na literatura (ZHENG; ZHANG; YANG, 2006) para a 7,4'-diidroxiflavana

	BPC-4 (CD ₃ OD)		HMBC		Literatura (CD ₃ OD)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., <i>J</i> Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., <i>J</i> Hz)
C						
7	157,68	-	H-6	H-5	156,3	-
4a	114,45	-	2H-4	H-6; H-8	113,2	-
8a	157,33	-	H-8	2H-4	155,6	-
1'	134,39	-		H-3'/5'	132,8	-
4'	158,26	-	H-3'/5'	H-2'/6'	156,0	-
CH						
2	79,16	4,88 (dd)		2H-4; H-2'/6'	77,7	4,80 (dd; 9,90; 1,65)
5	131,09	6,85 (d; 8,2)			129,8	6,89 (d; 8,20)
6	109,23	6,31 (dd; 8,2; 2,4)		H-8	108,1	6,28 (d; 8,20)
8	104,20	6,25 (d, 2,3)		H-6	103,2	6,24 (s)
2'	128,59	7,22 (d; 8,5)		H-2	127,5	7,12 (d; 8,40)
3'	116,22	6,78 (d; 8,5)			115,6	6,72 (d; 8,40)
5'	116,21	6,78 (d; 8,5)			115,6	6,72 (d; 8,40)
6'	128,58	7,22 (d; 8,5)		H-2	127,5	7,12 (d; 8,40)
CH₂						
3	31,45	2,11 e 1,97 (2H; m)	H-4		29,7	2,73 e 2,57 (2H; m)*
4	25,63	2,85 e 2,65 (2H; m)		H-5	24,4	1,99 e 1,94 (2H; m)*
7-OH	-	-			-	-
4'-OH	-	-			-	-

Fonte: o próprio autor.

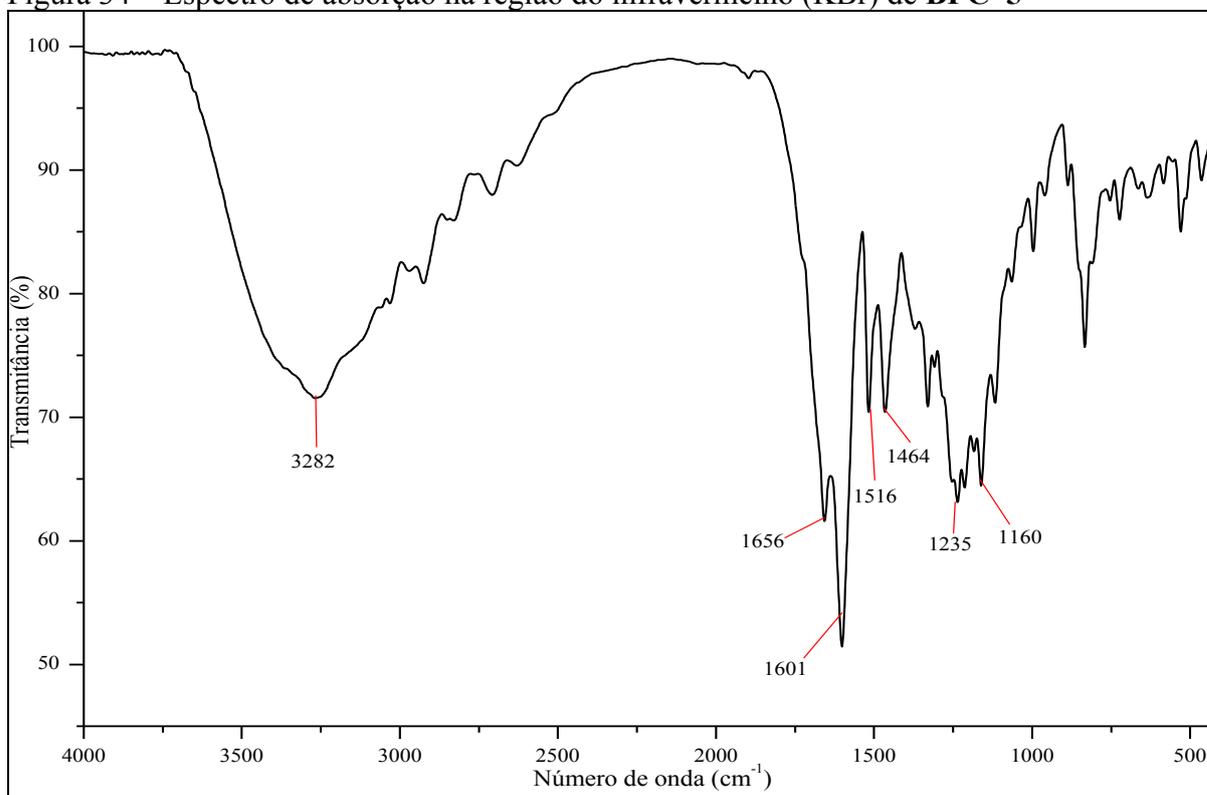
* É possível que os valores de deslocamentos químicos dos hidrogênios ligados aos carbonos C₃ e C₄ da literatura estejam trocados.

5.1.5 Determinação estrutural de BPC-5

O procedimento descrito no item 6.4.1.13 (pág. 123) resultou no isolamento de um sólido amorfo de coloração amarela (11,1 mg), solúvel em metanol, com ponto de fusão na faixa de 201–202 °C, literatura: p.f. = 207–208 °C (LI *et al.*, 2014), que foi denominado de **BPC-5**. Vale ressaltar que essa substância foi identificada através da comparação do seu tempo de retenção (t_R) com o padrão em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo, portanto, identificada como o flavonoide (2*S*)-4',7-diidroxiflavanona ((2*S*)-liquiritigenina), cuja estrutura é apresentada na Figura 42 (pág. 67).

No espectro de absorção na região do infravermelho (IV) de **BPC-5** (Figura 34) observou-se uma banda de absorção centrada em 3282 cm^{-1} referente à deformação axial de ligação O–H, identificando a presença de hidroxila; uma banda em 1656 cm^{-1} relacionada à deformação axial de ligação C=O; três bandas de absorção em 1601, 1516 e 1464 cm^{-1} , atribuídas à deformação axial de ligação C=C de anel aromático; duas bandas correspondentes à deformação axial de ligação C–O, em 1235 cm^{-1} e 1160 cm^{-1} (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA *et al.*, 2015).

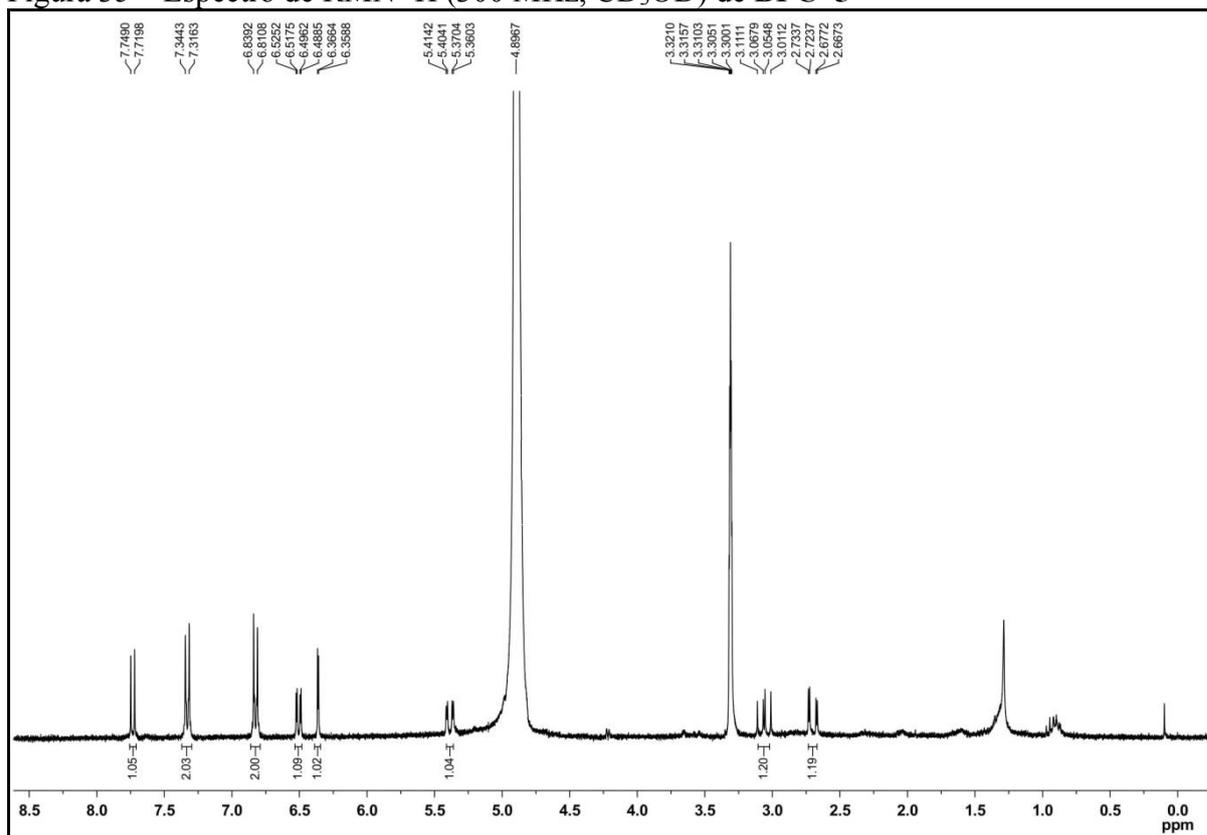
Figura 34 – Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de **BPC-5**



Fonte: o próprio autor.

O espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD , Figura 35) de **BPC-5** revelou sinais na região entre δ_{H} 6,35–7,74, evidenciando a presença de hidrogênios ligados a carbonos de anel aromático. Entre esses, três dupletos em δ_{H} 7,73 (1H; d; $J = 8,7$ Hz), δ_{H} 7,33 (2H; d; $J = 8,5$ Hz) e δ_{H} 6,82 (2H; d; $J = 8,5$ Hz), cujos valores dos deslocamentos químicos e de suas constantes de acoplamento, indicaram a presença de hidrogênios *orto* posicionados. O sinal em δ_{H} 6,51 (1H; dd; $J = 8,7$ e $2,3$ Hz) demonstrou o acoplamento de hidrogênio em posições *orto* e *meta*, respectivamente. Por outro lado, o sinal em δ_{H} 6,36 (1H, d, $J = 2,3$ Hz) indicou hidrogênio em posição *meta*. Além disso, o espectro apresentou um sinal em δ_{H} 5,39 (1H; dd; $J = 13,0$; $3,0$ Hz) correspondente a hidrogênio ligado a carbono oxigenado. Por fim, os sinais em δ_{H} 3,06 (1H; dd; $J = 16,9$ e $13,0$ Hz) e δ_{H} 2,70 (1H; $J = 16,9$ e $3,0$ Hz) foram relacionados a hidrogênios ligados a carbonos metilênicos (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA *et al.*, 2015).

Figura 35 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) de **BPC-5**

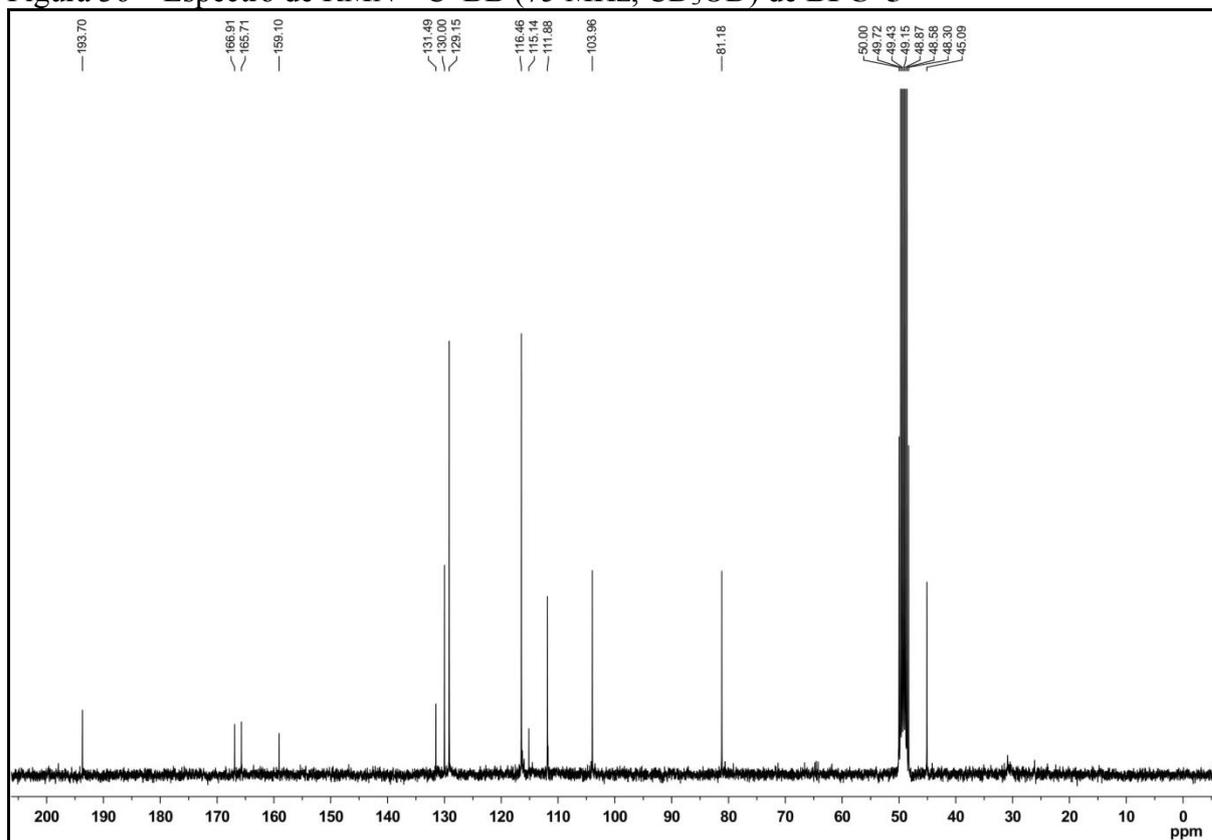


Fonte: o próprio autor.

A análise do espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CD_3OD , Figura 36, pág. 62) de **BPC-5** exibiu 13 linhas espectrais, apresentando quatro sinais mais desprotegidos em δ_{C} 193,70, δ_{C} 166,91, δ_{C} 165,71 e δ_{C} 159,10 associados a carbonos sp^2 oxigenados, dos quais, o sinal em δ_{C} 193,70 está relacionado a carbono carbonílico. O espectro apresentou também

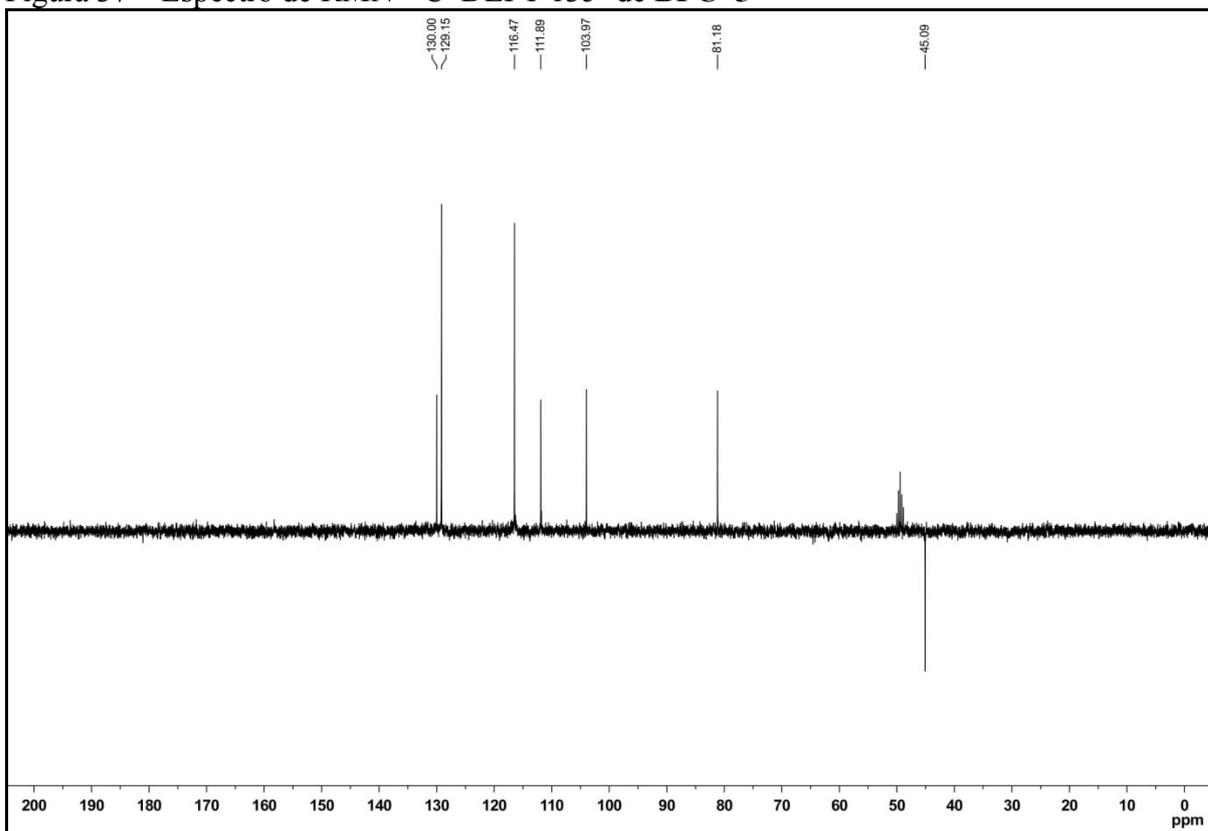
dois sinais, sendo um em δ_C 129,15 e o outro em δ_C 116,46. Vale ressaltar que devido às suas intensidades, cada um dos sinais foi atribuído a dois átomos de carbonos. Através da comparação dos espectros RMN ^{13}C -BB e ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CD_3OD , Figura 37, pág. 63) foi possível determinar o padrão de hidrogenação dos átomos de carbono, sendo, portanto, identificados seis sinais de carbonos desidrogenados (C), oito carbonos metínicos (CH) e um carbono metilênico (CH_2) (Tabela 6, pág. 68).

Figura 36 – Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CD_3OD) de **BPC-5**



Fonte: o próprio autor.

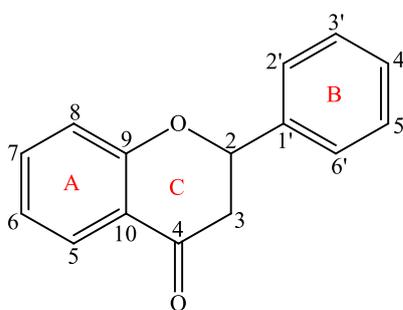
Figura 37 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de **BPC-5**



Fonte: o próprio autor.

Diante dos dados espectroscópicos de **BPC-5**, foi possível sugerir a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$, cujo índice de deficiência de hidrogênio (IDH) é igual a dez. A presença de sinais compatíveis com um esqueleto de uma flavanona (Figura 38) foram confirmados através do sinal em δ_{C} 193,70 (C-4) para carbono de carbonila, bem como do sinal em δ_{C} 81,18 (C-2) associado a um carbono oximetínico e do sinal em δ_{C} 45,09 (C-3) atribuído a carbono metilênico.

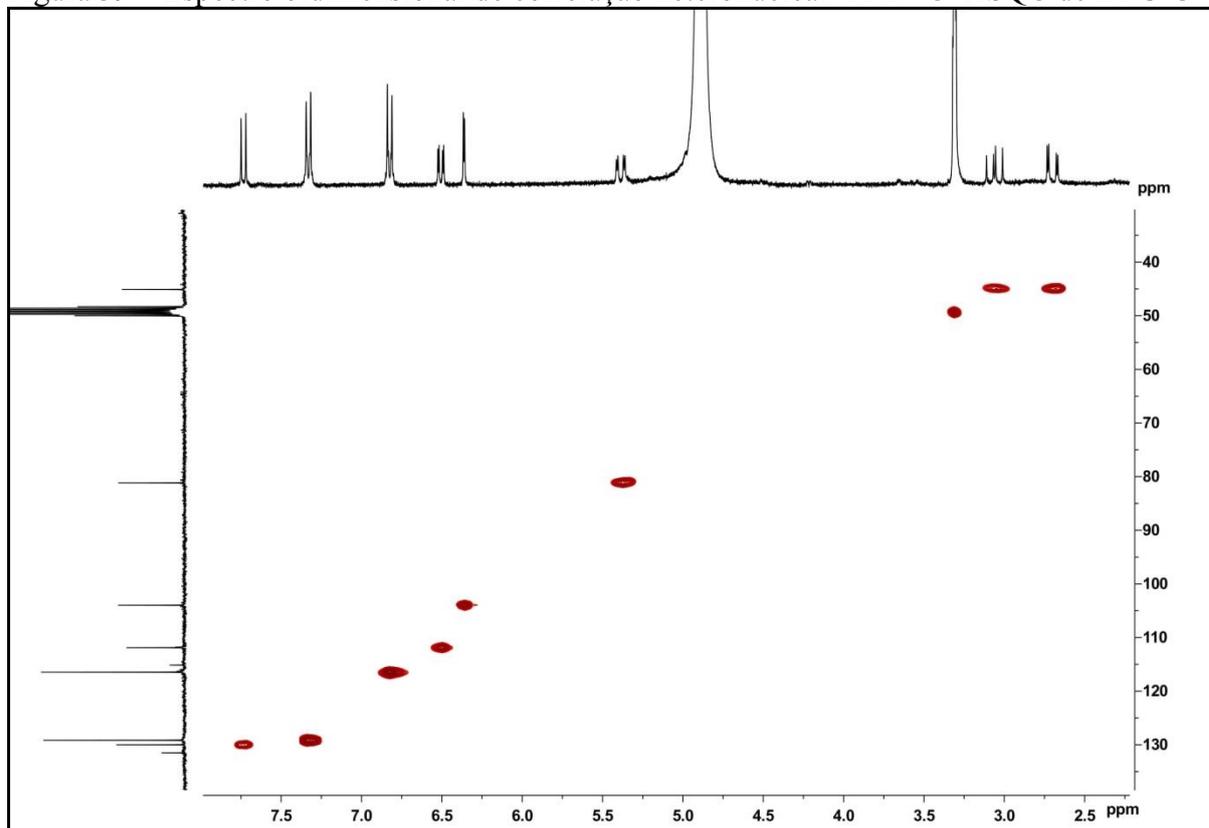
Figura 38 – Esqueleto básico de uma flavanona



Fonte: o próprio autor.

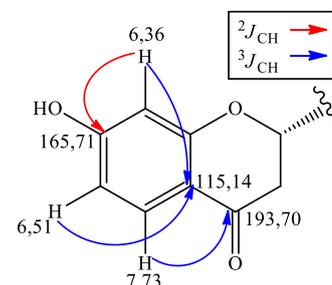
Através da análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HSQC (Figura 39) foi possível fazer a associação direta entre todos os sinais de hidrogênios aos seus respectivos átomos de carbonos (Tabela 6, pág. 68).

Figura 39 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HSQC de **BPC-5**



Fonte: o próprio autor.

A análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$ -HMBC de **BPC-5** (Figura 40, pág. 65) permitiu definir as posições dos substituintes no esqueleto básico. As correlações dos hidrogênios do anel A contribuíram para fixar a posição da hidroxila. Observou-se a correlação a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) entre o hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 7,73$ (H-5) com o carbono da carbonila em $\delta_{\text{C}} 193,70$ (C-4). Outras correlações a $^3J_{\text{CH}}$ também foram observadas referentes aos hidrogênios em $\delta_{\text{H}} 6,51$ (H-6) e $\delta_{\text{H}} 6,36$ (H-8) com o carbono em $\delta_{\text{C}} 115,14$ (C-10). Além disso, mostrou a correlação a duas ligações ($^2J_{\text{CH}}$) entre o hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 6,36$ (H-8) com o carbono em $\delta_{\text{C}} 165,71$ (C-7).



O sistema *para* substituído do anel B é perceptível pela forma como os sinais de hidrogênios se apresentam no espectro de RMN ^1H , pois, esses estão na forma de dupletos com integração para dois hidrogênios cada. Adicionalmente, as correlações dos hidrogênios dos anéis B e C, confirmaram a posição da hidroxila. Os hidrogênios em δ_{H} 6,82 (H-3'/5') correlacionaram a $^2J_{\text{CH}}$ com o carbono C-4' (δ_{C} 159,10). Vale ressaltar que os hidrogênios em δ_{H} 7,33 (H-2'/6') correlacionaram a $^3J_{\text{CH}}$ com o carbono em δ_{C} 81,18 (C-2) e o hidrogênio em δ_{H} 5,39 (H-2) com os carbonos em δ_{C} 129,15 (C-2'/6'). Além disso, os hidrogênios em δ_{H} 3,06 (H-3) e δ_{H} 2,70 (H-3) correlacionaram a duas ligações com o carbono da carbonila em δ_{C} 193,70 (C-4).

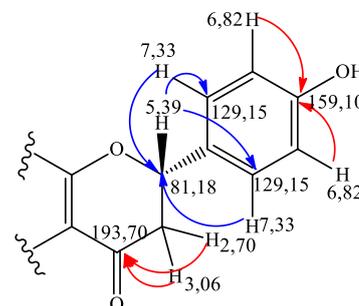
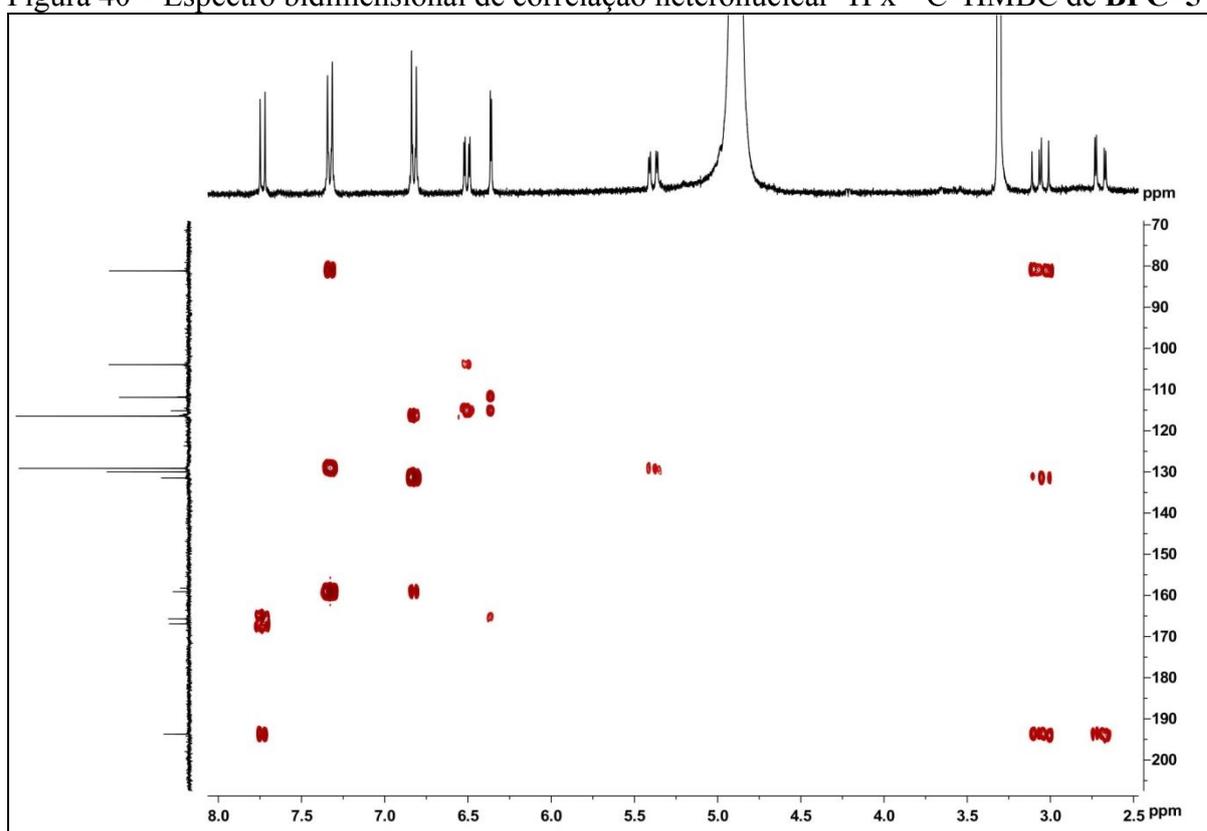


Figura 40 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de **BPC-5**



Fonte: o próprio autor.

No espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (Figura 41) de **BPC-5** observou-se as correlações dos hidrogênios em posições *orto* entre δ_{H} 7,33 (H-2'/6') e δ_{H} 6,82 (H-3'/5') e entre δ_{H} 7,73 (H-5) e δ_{H} 6,51 (H-6). O espectro também mostrou as correlações entre os hidrogênios em δ_{H} 5,39 (H-2) e δ_{H} 3,06 (H-3), bem como entre δ_{H} 3,06 (H-3) e δ_{H} 2,70 (H-3). Essas correlações confirmaram os sistemas na estrutura proposta.

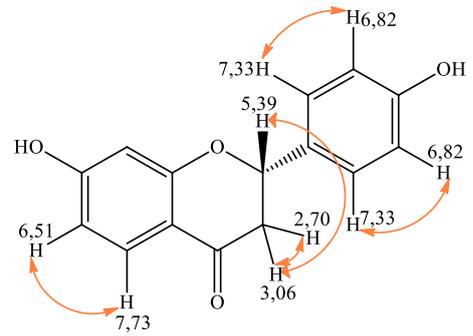
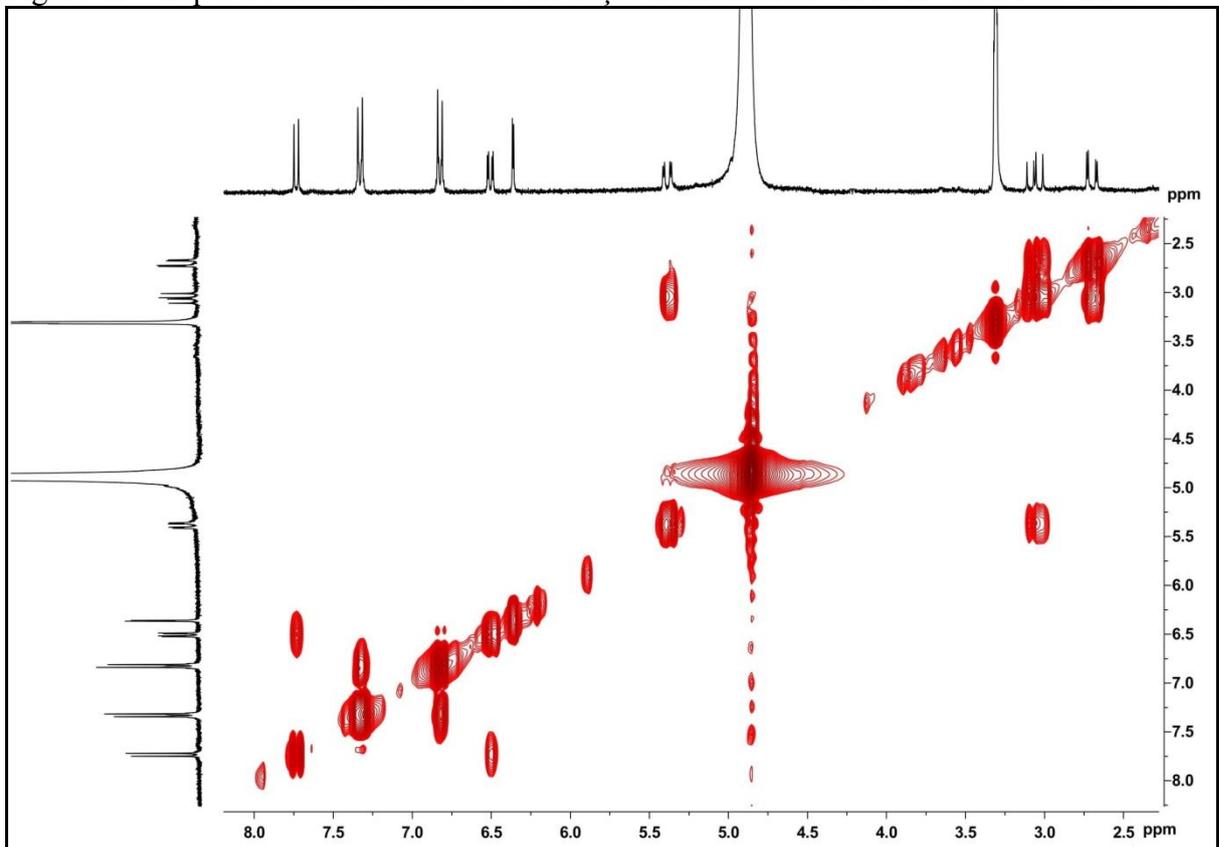


Figura 41 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de **BPC-5**



Fonte: o próprio autor.

Tabela 6 – Dados espectroscópicos de **BPC-5** comparados com os dados descritos na literatura (ZHANG *et al.*, 2018b) para a (2*S*)-4',7-diidroxiflavanona (liquiritigenina)

	BPC-5 (CD ₃ OD)		HMBC		Literatura (CD ₃ OD)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., <i>J</i> Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., <i>J</i> Hz)
C						
4	193,70	-	H-3	H-5	193,6	-
7	165,71	-	H-8		167,3	-
9	166,91	-			165,6	-
10	115,14	-		H-6; H-8	114,8	-
1'	131,49	-			131,4	-
4'	159,10	-	H-3' 3'/5'	H-2'/6'	158,9	-
CH						
2	81,18	5,39 (dd; 13,0; 3,0)		H-2'/6'	81,0	5,34 (dd; 13,5; 3,0)
5	130,00	7,73 (d; 8,7)			129,9	7,73 (d; 8,5)
6	111,88	6,51 (dd; 8,7; 2,3)		H-8	112,0	6,51 (dd; 8,5; 2,5)
8	103,96	6,36 (d; 2,3)		H-6	104,0	6,36 (d; 2,0)
2'	129,15	7,33 (d; 8,5)		H-2	129,0	7,32 (d; 8,5)
3'	116,46	6,82 (d; 8,5)			116,4	6,84 (d; 8,5)
5'	116,46	6,82 (d; 8,5)			116,4	6,84 (d; 8,5)
6'	129,15	7,33 (d; 8,5)		H-2	129,0	7,32 (d; 8,5)
CH₂						
3 _{ax}		3,06 (dd; 16,9; 13,0)				3,03 (dd; 17,0; 13,5)
	45,09				45,0	
3 _{eq}		2,70 (dd; 16,9; 3,0)				2,68 (dd; 17,0; 3,0)
7-OH	-	-			-	-
4'-OH	-	-			-	-

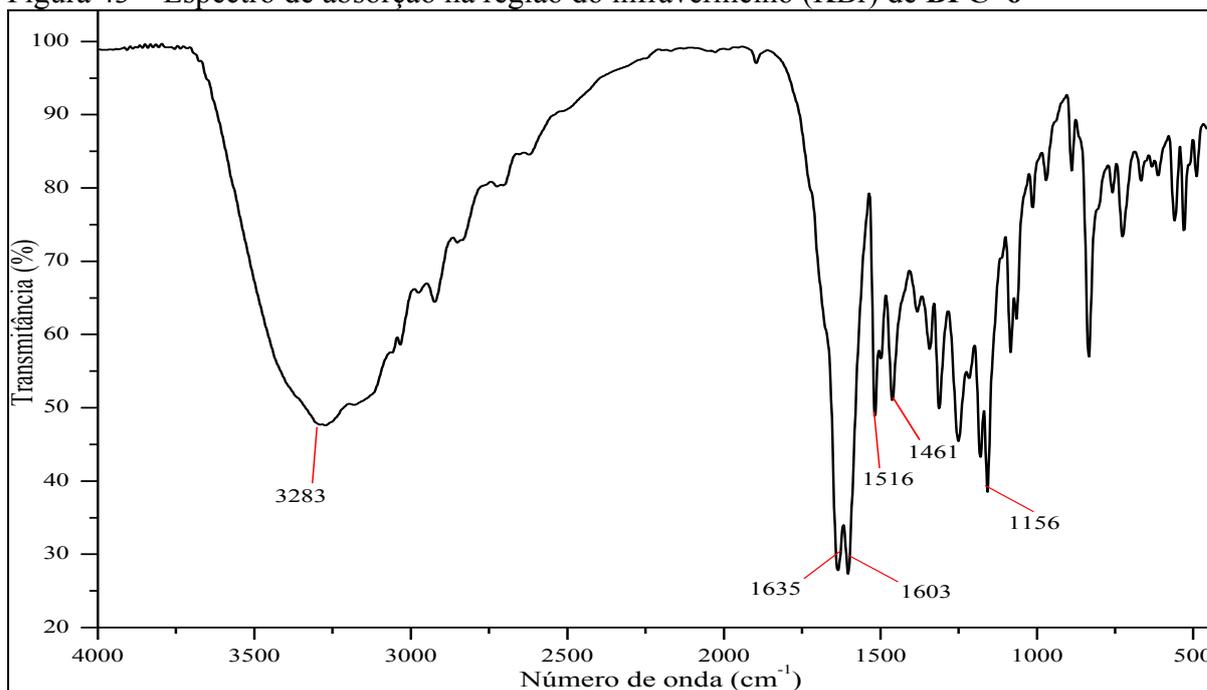
Fonte: o próprio autor.

5.1.6 Determinação estrutural de BPC-6

O procedimento descrito no item 6.4.1.13 (pág. 123) resultou no isolamento de um sólido amorfo de coloração amarela (25,0 mg), solúvel em metanol, com ponto de fusão na faixa de 194–195 °C, literatura: p.f. = 250–252 °C (ZEKRY *et al.*, 2015) que foi denominado de **BPC-6**. Destaca-se que a identificação dessa substância foi realizada por meio da comparação do seu tempo de retenção (t_R) com o do padrão (2*S*)-naringenina em cromatografia líquida de alta eficiência, sendo, portanto, caracterizado como o flavonoide (2*S*)-4',5,7-triidroxi-flavanona ((2*S*)-naringenina), cuja estrutura é apresentada na Figura 46 (pág. 72). A estrutura química de **BPC-6** foi confirmada utilizando como base a estrutura de **BPC-5** (item 5.1.5; pág. 60) e através da interpretação dos espectros de IV, RMN ^1H e ^{13}C -BB. Vale ressaltar que a estrutura de **BPC-6** possui uma hidroxila adicional no carbono 5.

O espectro de absorção na região do infravermelho (IV) de **BPC-6** (Figura 43) exibiu bandas de absorção, em 3283 cm^{-1} e 1635 cm^{-1} correspondentes à deformação axial de ligação O–H e deformação axial de ligação C=O, respectivamente. Adicionalmente, o espectro mostrou três bandas de absorção atribuídas à deformação axial de ligação C=C de anel aromático em 1601, 1516 e 1464 cm^{-1} . Além disso, foram observadas duas bandas correspondentes à deformação axial de ligação C–O, em 1235 cm^{-1} e 1160 cm^{-1} (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA *et al.*, 2015).

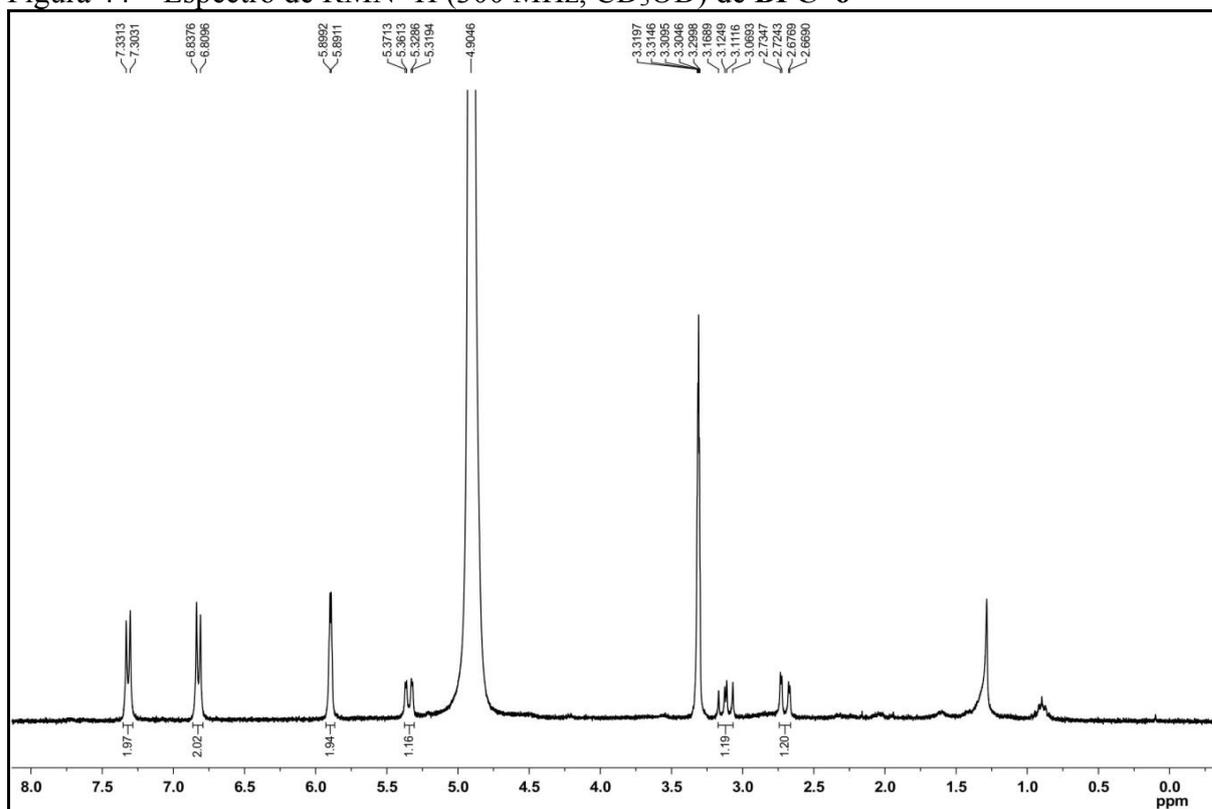
Figura 43 – Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de **BPC-6**



Fonte: o próprio autor.

No espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD , Figura 44) de **BPC-6**, quando comparado com o correspondente espectro de **BPC-5** (Figura 35, pág. 61), observou-se um número menor de sinais na região entre δ_{H} 7,75–5,88, correspondentes a hidrogênios ligados a carbonos de anel aromático, indicando um número maior de substituintes em sua estrutura química (Figura 46, pág. 72). Foram observados dois dupletos em δ_{H} 7,32 (2H; d; $J = 8,4$ Hz) e δ_{H} 6,82 (2H; d; $J = 8,4$ Hz) atribuídos a hidrogênios *orto* posicionados em um sistema *para* substituído, que foram confirmados através dos valores de deslocamentos químicos, bem como das integrações e de suas constantes de acoplamento. Além disso, o espectro mostrou um sinal em δ_{H} 5,89 (2H; d; $J = 2,4$ Hz), atribuído a hidrogênios em posição *meta* e outro sinal em δ_{H} 5,34 (1H; dd; $J = 12,7; 2,9$ Hz) relacionado a hidrogênio ligado a carbono oxigenado. Adicionalmente, os sinais em δ_{H} 3,12 (1H; dd; $J = 16,9$ e $12,9$ Hz) e δ_{H} 2,70 (1H; $J = 17,0$ e $2,7$ Hz) foram inferidos a hidrogênios ligados a carbonos metilênicos. (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA *et al.*, 2015).

Figura 44 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) de **BPC-6**

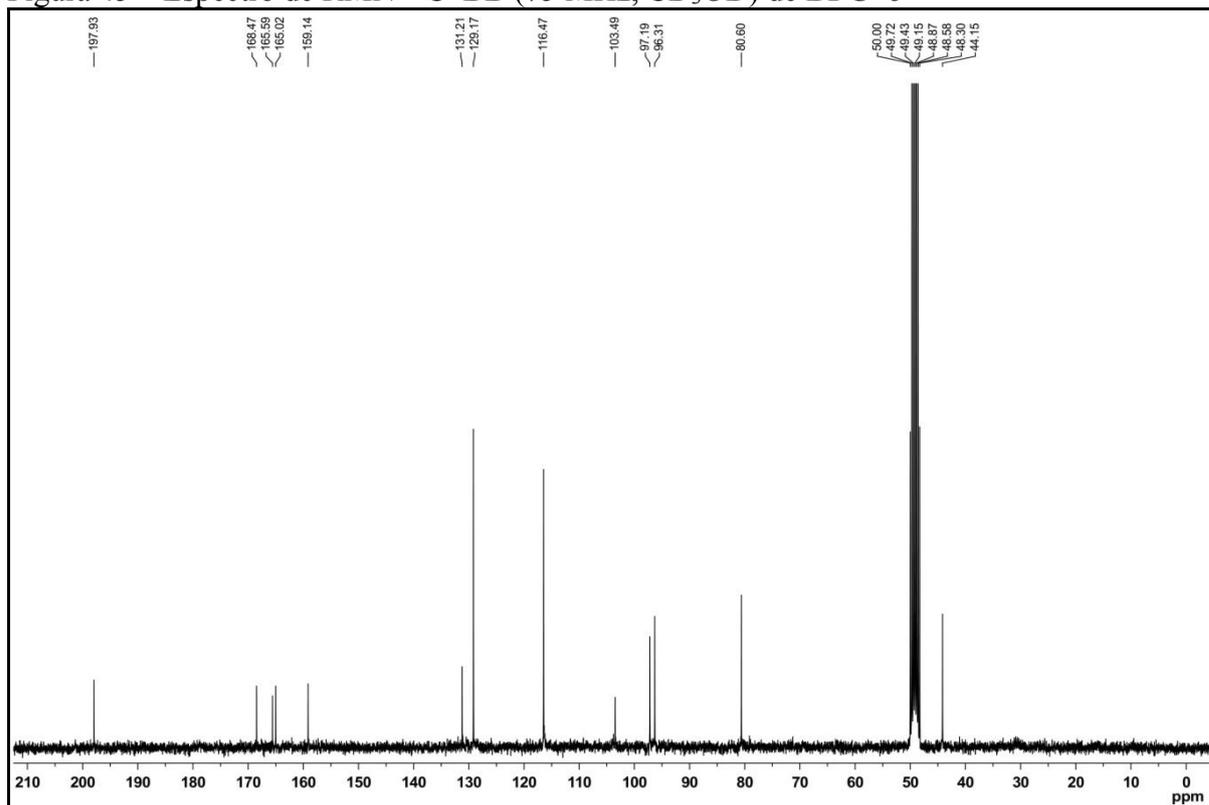


Fonte: o próprio autor.

No espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CD_3OD , Figura 45, pág. 71) de **BPC-6** foi possível observar 13 linhas espectrais, com destaque para cinco sinais mais desprotegidos em δ_{C} 197,93, δ_{C} 168,47, δ_{C} 165,59, δ_{C} 165,02 e δ_{C} 159,14 que foram relacionados a carbonos

oxigenados com hibridização sp^2 , sendo o sinal em δ_C 197,93 associado a carbono carbonílico. O espectro também mostrou a presença de dois sinais em δ_C 129,17 e em δ_C 116,47, ambos relacionados a dois átomos de carbono, devido as suas intensidades. Vale ressaltar que os sinais em δ_C 80,60 e δ_C 44,15, foram associados a carbonos oximetínico e metilênico, respectivamente.

Figura 45 – Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CD_3OD) de **BPC-6**

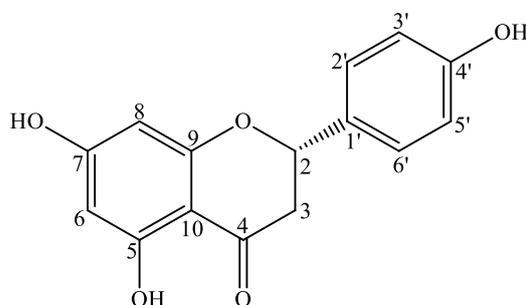


Fonte: o próprio autor.

A análise dos dados espectroscópicos obtidos e posterior comparação com dados descritos na literatura (ZEKRY *et al.*, 2015, Tabela 7, pág. 72) confirmou a identidade do flavonoide da classe das flavanonas de fórmula molecular $C_{15}H_{12}O_5$ denominado de (2*S*)-naringenina, cujo nome sistemático é (2*S*)-5,7,4'-triidroxiflavanona (Figura 46, pág. 72). Vale ressaltar-se que esse composto já foi isolado de duas espécies do gênero *Bauhinia*, tais como *B. unguolata* (SOUSA *et al.*, 2016) e *B. sirindhorniae* (ATHIKOMKULCHAI; SRIUBOLMAS; RUANGRUNGSI, 2005). Pesquisas revelaram que essa substância exibe diversas atividades, tais como anti-Alzheimer (GHOFRANI *et al.*, 2015), anti-Chikungunya (AHMADI *et al.*, 2016), antimicrobiana (KOZLOWSKA *et al.*, 2017), anticâncer (LIM *et al.*, 2017), antioxidante (LIANG *et al.*, 2017), antidiabética (AL-DOSARI *et al.*, 2017), anti-

inflamatória (JIN *et al.*, 2017), anti-dengue (FRABASILE *et al.*, 2017). Destaca-se que essa substância está sendo descrita pela primeira vez na espécie *B. pentandra*.

Figura 46 – Estrutura da (2*S*)-naringenina



Fonte: o próprio autor.

Tabela 7 – Dados espectroscópicos de **BPC-6** comparados com os dados descritos na literatura (ZEKRY *et al.*, 2015) para a (2*S*)-4',5,7-triidroxiflavanona (naringenina)

	BPC-6 (CD₃OD)		Literatura (CD₃OD)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., <i>J</i> Hz)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., <i>J</i> Hz)
C				
4	197,93	-	196,7	-
5	165,59	-	163,9	-
7	168,47	-	167,1	-
9	165,02	-	163,4	-
10	103,49	-	102,2	-
1'	131,21	-	129,3	-
4'	159,14	-	158,2	-
CH				
2	80,60	5,34 (dd; 12,7; 2,9)	78,9	5,43 (dd; 12,8; 2,8)
6	97,19	5,89 (d; 2,4)	96,2	5,86 (s)
8	96,31	5,89 (d; 2,4)	95,4	5,86 (s)
2'	129,17	7,32 (d; 8,4)	128,7	7,30 (d; 8,4)
3'	116,47	6,82 (d; 8,4)	115,6	6,78 (d; 8,4)
5'	116,47	6,82 (d; 8,4)	115,6	6,78 (d; 8,4)
6'	129,17	7,32 (d; 8,4)	128,7	7,30 (d; 8,4)
CH₂				
3 _{ax}	44,15	3,12 (dd; 16,9; 12,9)	42,4	3,27 (dd; 17,2; 12,8)
3 _{eq}		2,70 (dd; 17,0; 2,7)		2,68 (dd; 17,2; 2,8)
5-OH	-	-	-	-
7-OH	-	-	-	-
4'-OH	-	-	-	-

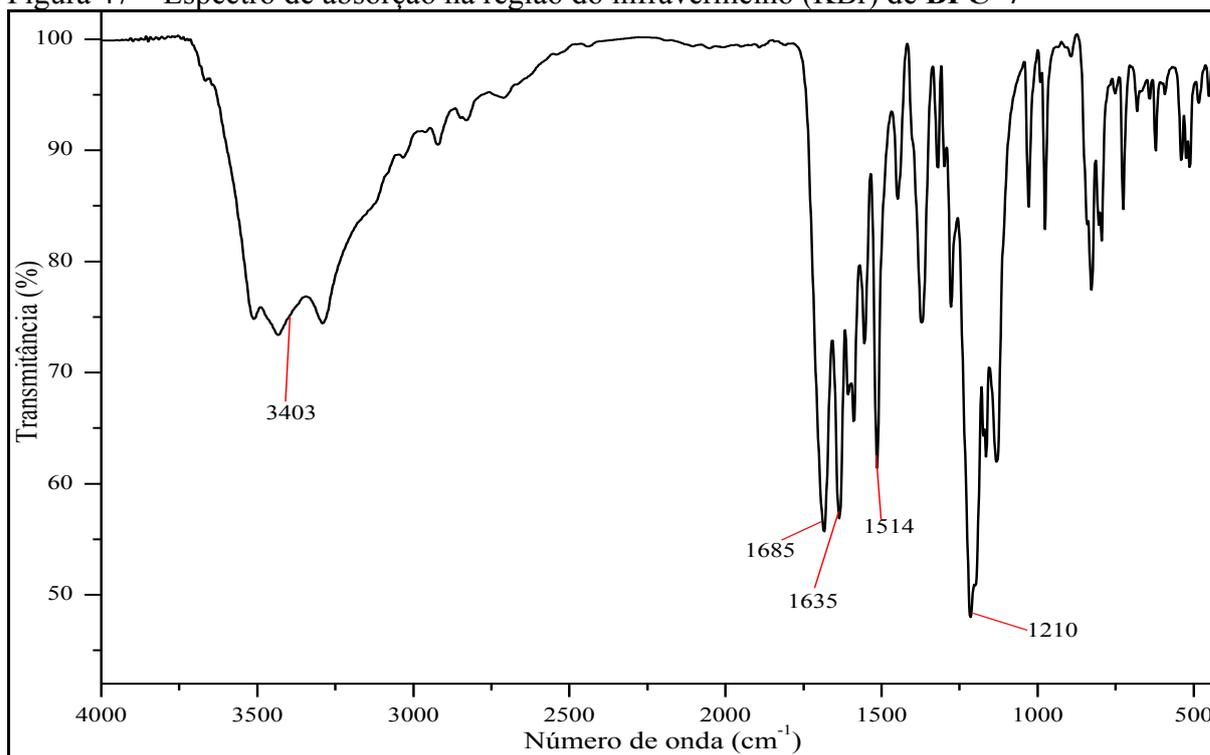
Fonte: o próprio autor.

5.1.7 Determinação estrutural de BPC-7

O procedimento descrito no item 6.4.1.13 (pág. 123) resultou no isolamento de um sólido amorfo de cor amarela (24,7 mg), solúvel em metanol, com ponto de fusão na faixa de 176–177 °C, literatura: p.f. = 188–191 °C (JANG *et al.*, 2003), que foi denominado **BPC-7**.

O espectro de absorção na região do infravermelho (IV) de **BPC-7** (Figura 47) exibiu uma banda em 3403 cm^{-1} característica de deformação axial de ligação O–H; uma absorção em 1685 cm^{-1} relacionada à deformação axial de ligação C=O conjugada; duas absorções, sendo uma em 1635 cm^{-1} e outra em 1614 cm^{-1} características de deformação axial de ligação C=C e uma banda em 1210 cm^{-1} relacionada à deformação axial de ligação C–O (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA *et al.*, 2015).

Figura 47 – Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de **BPC-7**

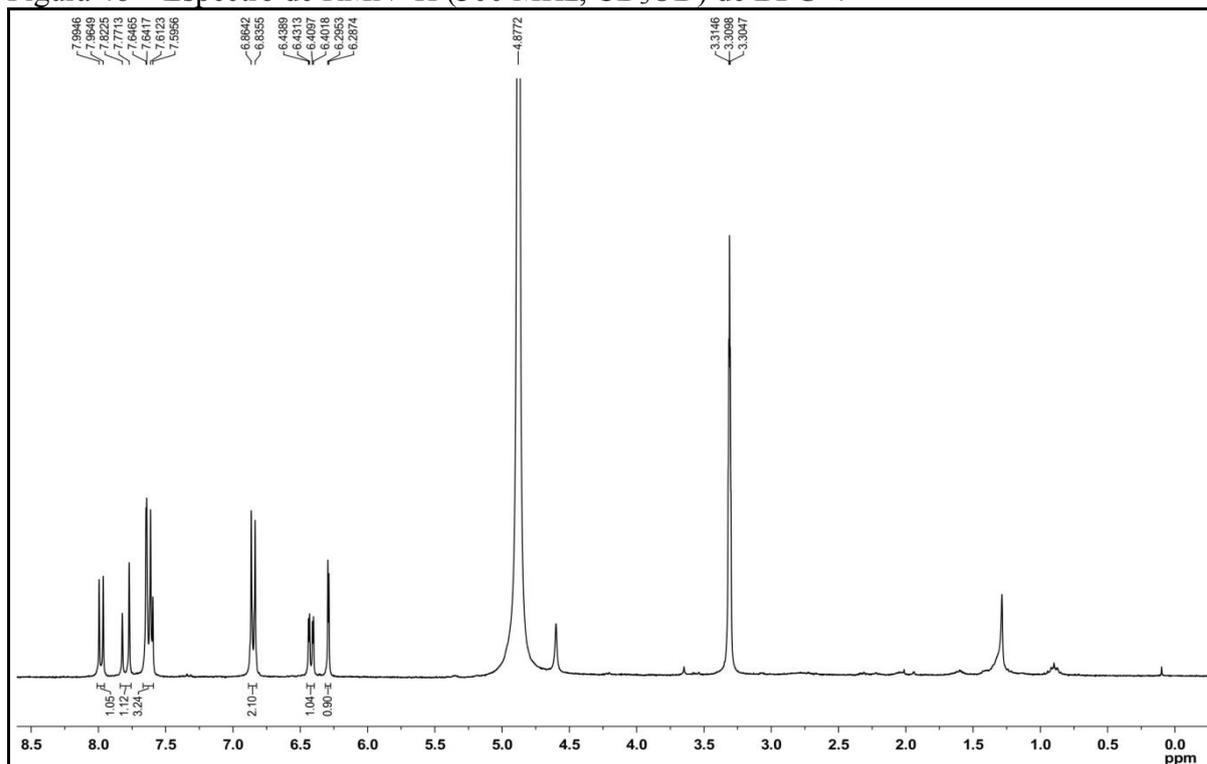


Fonte: o próprio autor.

O espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD , Figura 48, pág. 74) de **BPC-7** mostrou sinais na região entre δ_{H} 6,28–8,00, sinalizando a presença de hidrogênios ligados a carbonos insaturados. Foram observados sinais relacionados a hidrogênios ligados a anel aromático em posicionamento *orto* em δ_{H} 7,98 (1H; d; $J = 8,9$ Hz), δ_{H} 7,63 (2H; d; $J = 8,8$ Hz) e δ_{H} 6,85 (2H; d; $J = 8,6$ Hz). Adicionalmente, o sinal em δ_{H} 6,42 (1H; dd; $J = 8,9$ e 2,3

Hz) indicou a presença de hidrogênio em posições *orto* e *meta*. Já o sinal em δ_H 6,29 (1H; d; $J = 2,4$ Hz) é referente a hidrogênio em posição *meta*. Além disso, o espectro apresentou dois sinais, um em δ_H 7,80 (1H; d; $J = 15,4$ Hz) e o outro em δ_H 7,62 (1H; d; $J = 15,4$ Hz), associados a hidrogênios ligados a carbonos de dupla ligação em configuração *trans*, devido ao valor da constante de acoplamento.

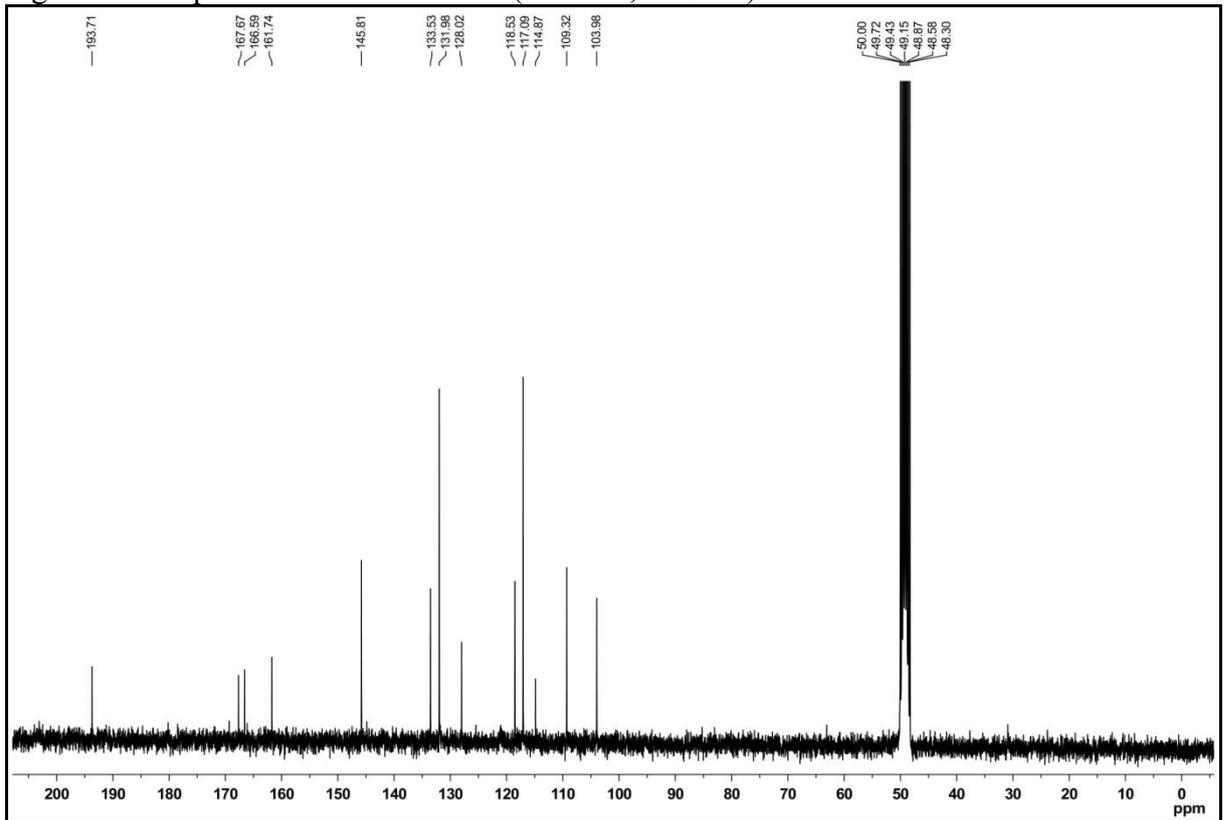
Figura 48 – Espectro de RMN 1H (300 MHz, CD_3OD) de **BPC-7**



Fonte: o próprio autor.

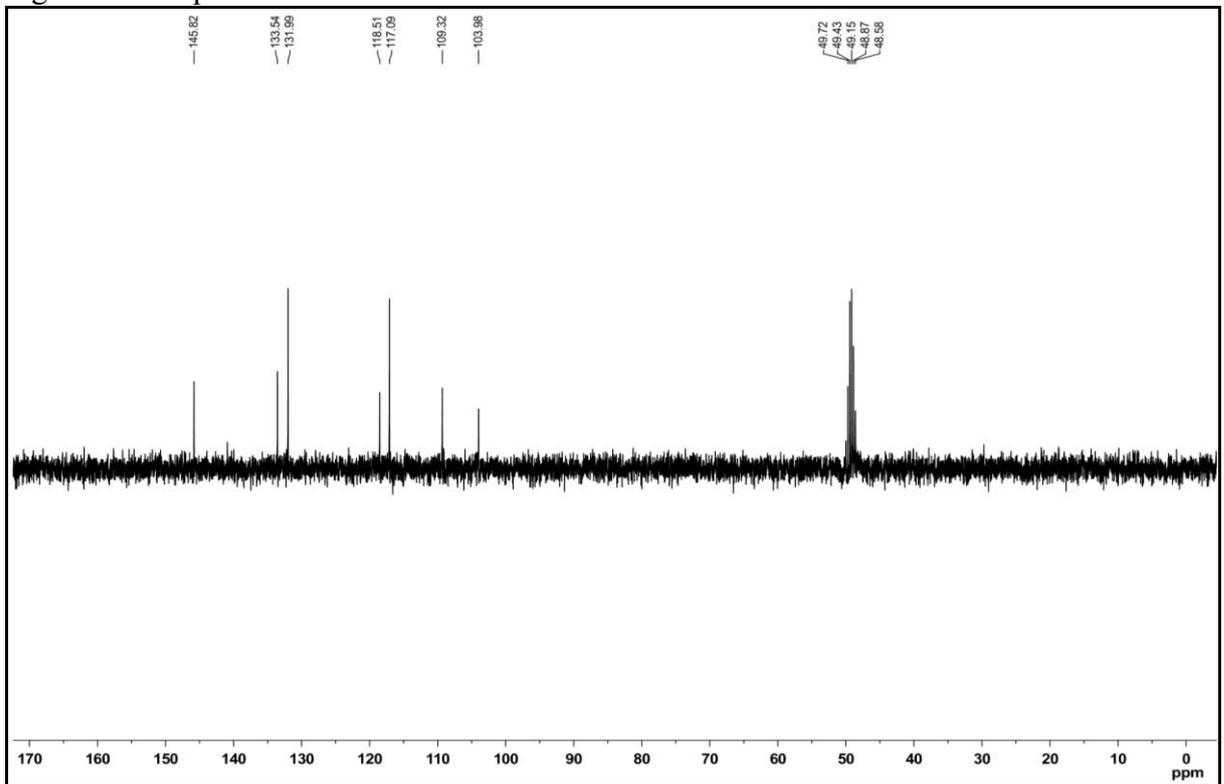
O espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CD_3OD , Figura 49, pág. 75) de **BPC-7** apresentou 13 linhas espectrais, todas na região de carbonos insaturados, onde há quatro sinais mais desprotegidos em δ_C 193,71, δ_C 167,67, δ_C 166,59 e δ_C 161,74, relativos a carbonos sp^2 oxigenados, sendo o sinal em δ_C 193,71 referente a um carbono de carbonila. A comparação dos espectros de RMN ^{13}C -BB e ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CD_3OD , Figura 50, pág. 75) possibilitou diferenciar o padrão de hidrogenação dos átomos de carbono, sendo quatro sinais relacionados a carbonos desidrogenados (C) e nove absorções para carbonos metínicos (CH). Os sinais em δ_C 131,98 e δ_C 117,09 foram atribuídos a dois átomos de carbonos cada, devido às intensidades em comparação com os demais de mesmo padrão de hidrogenação, totalizando 15 átomos de carbono (Tabela 8, pág. 80).

Figura 49 – Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CD_3OD) de **BPC-7**



Fonte: o próprio autor.

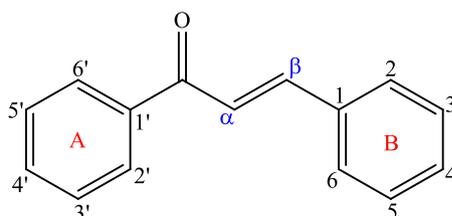
Figura 50 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de **BPC-7**



Fonte: o próprio autor.

Através da análise dos dados espectroscópicos, propôs-se a fórmula molecular $C_{15}H_{12}O_4$, com índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a dez, correspondente a um provável esqueleto básico de uma chalcona (Figura 51).

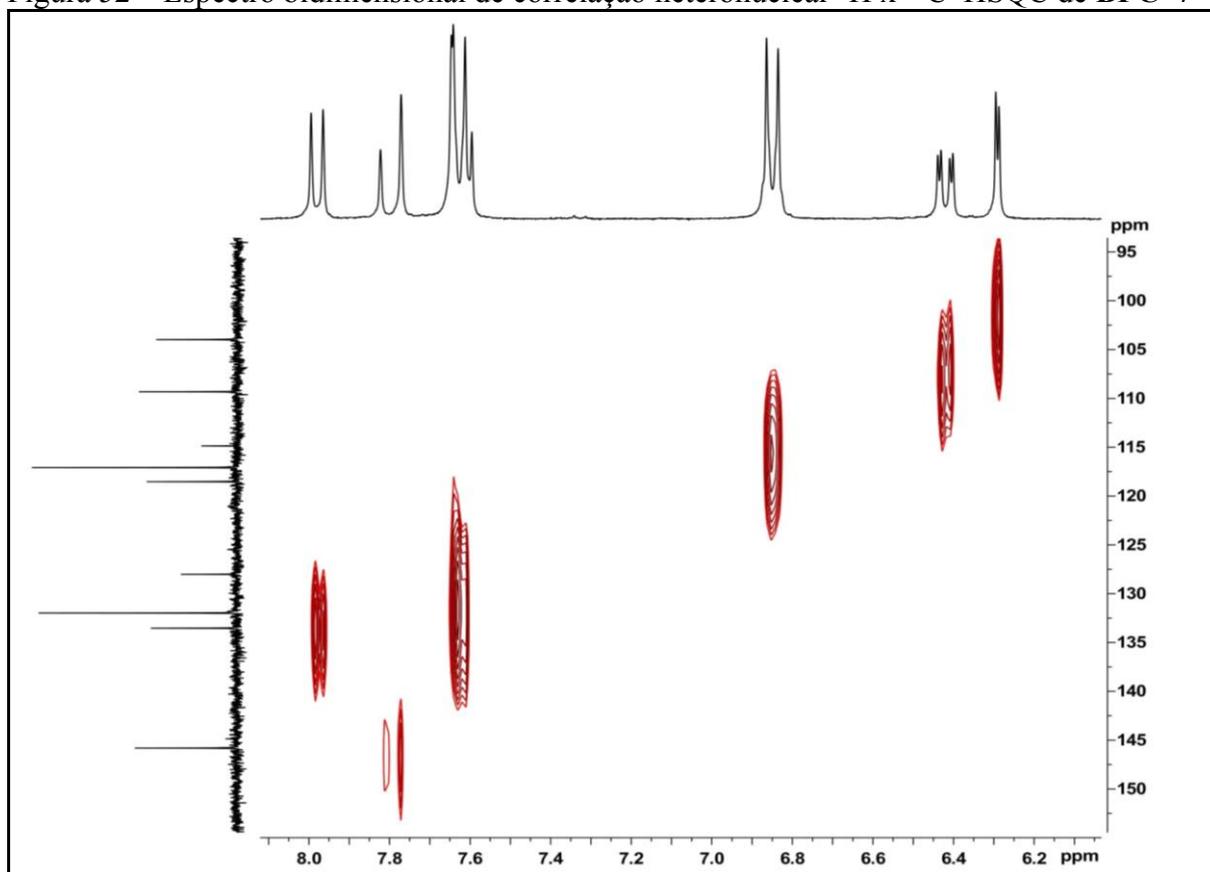
Figura 51 – Esqueleto básico de **BPC-7**



Fonte: o próprio autor.

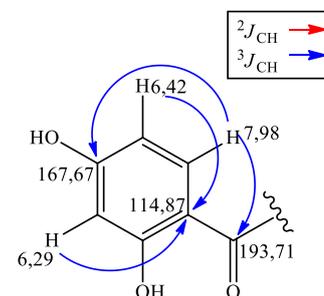
O espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1H \times ^{13}C$ -HSQC (Figura 52) propiciou a associação direta entre os sinais de hidrogênios aos seus respectivos átomos de carbonos, conforme mostrado na Tabela 8 (pág. 80).

Figura 52 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1H \times ^{13}C$ -HSQC de **BPC-7**

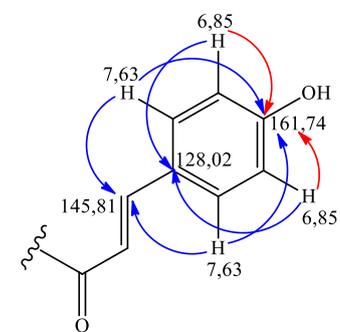


Fonte: o próprio autor.

Através da análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^{13}C x ^1H -HMBC de **BPC-7** (Figura 53, pág. 78) foi possível definir a localização das hidroxilas nos anéis aromáticos. O hidrogênio em δ_{H} 7,98 (H-6') correlacionou a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) com os carbonos em δ_{C} 167,67 (C-4') e δ_{C} 193,71 (C-9) fixando assim, a posição desse hidrogênio. Já o hidrogênio em δ_{H} 6,42 (H-5') correlaciona a $^3J_{\text{CH}}$ com o carbono em δ_{C} 114,87 (C-1'). Por sua vez, o hidrogênio em δ_{H} 6,29 (H-3') mostrou correlação a $^3J_{\text{CH}}$ com o carbono em δ_{C} 114,87 (C-1'). Dessa forma, foi possível definir as posições das hidroxilas nos carbonos C-2' e C-4'.



As correlações dos hidrogênios no outro anel aromático confirmaram a posição da hidroxila, pois já era evidenciada pela forma como os sinais de hidrogênios apareceram no espectro de RMN ^1H , no qual, foram observados dois dupletos integrados para dois átomos de hidrogênio cada, totalizando quatro hidrogênios, indicando que o anel aromático seria *para* substituído. Os hidrogênios em δ_{H} 6,85 (H-3/5) correlacionaram a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) e duas ligações ($^2J_{\text{CH}}$) com os carbonos em δ_{C} 128,02 (C-1) e δ_{C} 161,74 (C-4), respectivamente. Adicionalmente, os hidrogênios em δ_{H} 7,63 (H-2/6) mostraram correlações a $^3J_{\text{CH}}$ com os carbonos em δ_{C} 161,74 (C-4) e δ_{C} 145,81 (C-7), confirmando a posição desses hidrogênios.



O espectro mostrou também as correlações dos hidrogênios ligados aos carbonos de dupla ligação, onde o hidrogênio em δ_{H} 7,80 (H-7) correlaciona a três ligações com os carbonos em δ_{C} 131,98 (C-2'/6'), δ_{C} 193,71 (C-9) e a duas ligações com o carbono em δ_{C} 118,53 (C-8). Enquanto o hidrogênio em δ_{H} 7,62 (H-8) correlaciona a $^3J_{\text{CH}}$ com o carbono em δ_{C} 128,02 (C-1) e a $^2J_{\text{CH}}$ com os carbonos em δ_{C} 193,71 (C-9) e δ_{C} 145,81 (C-7), confirmando a posição desses hidrogênios.

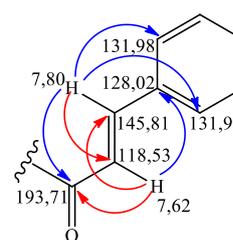
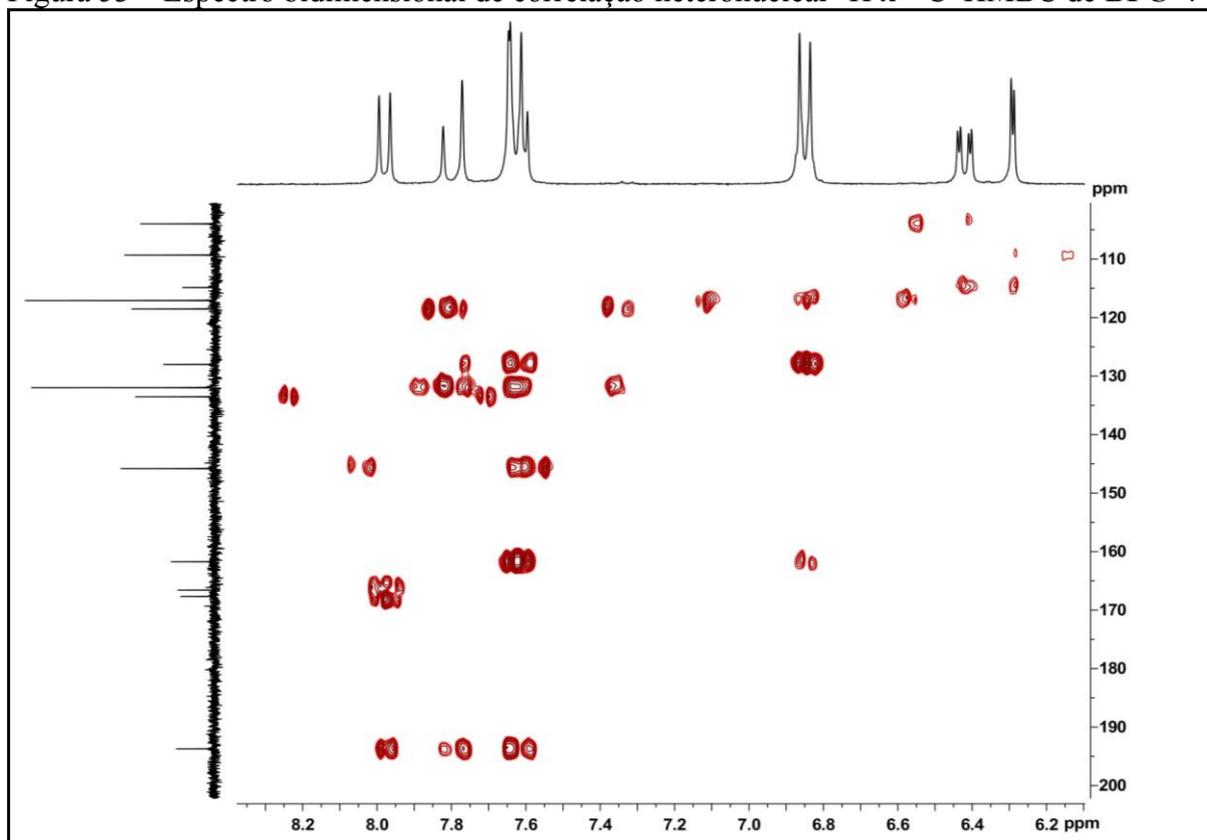


Figura 53 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de **BPC-7**



Fonte: o próprio autor.

O espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (Figura 54, pág. 79) de **BPC-7** exibiu as correlações dos hidrogênios em posicionamento *orto* entre H-5' (δ_{H} 6,42) e H-6' (δ_{H} 7,98), bem como entre os hidrogênios H-2'/6' (δ_{H} 7,63) e H-3'/5' (δ_{H} 6,85). Além disso, mostrou a correlação entre os hidrogênios H-7 (δ_{H} 7,80) e H-8 (δ_{H} 7,62). Dessa forma, as correlações confirmaram os sistemas propostos.

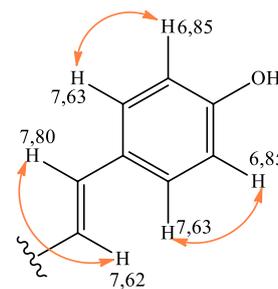
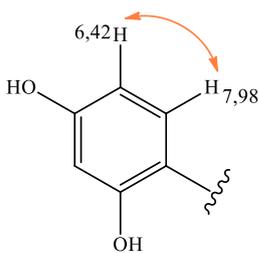
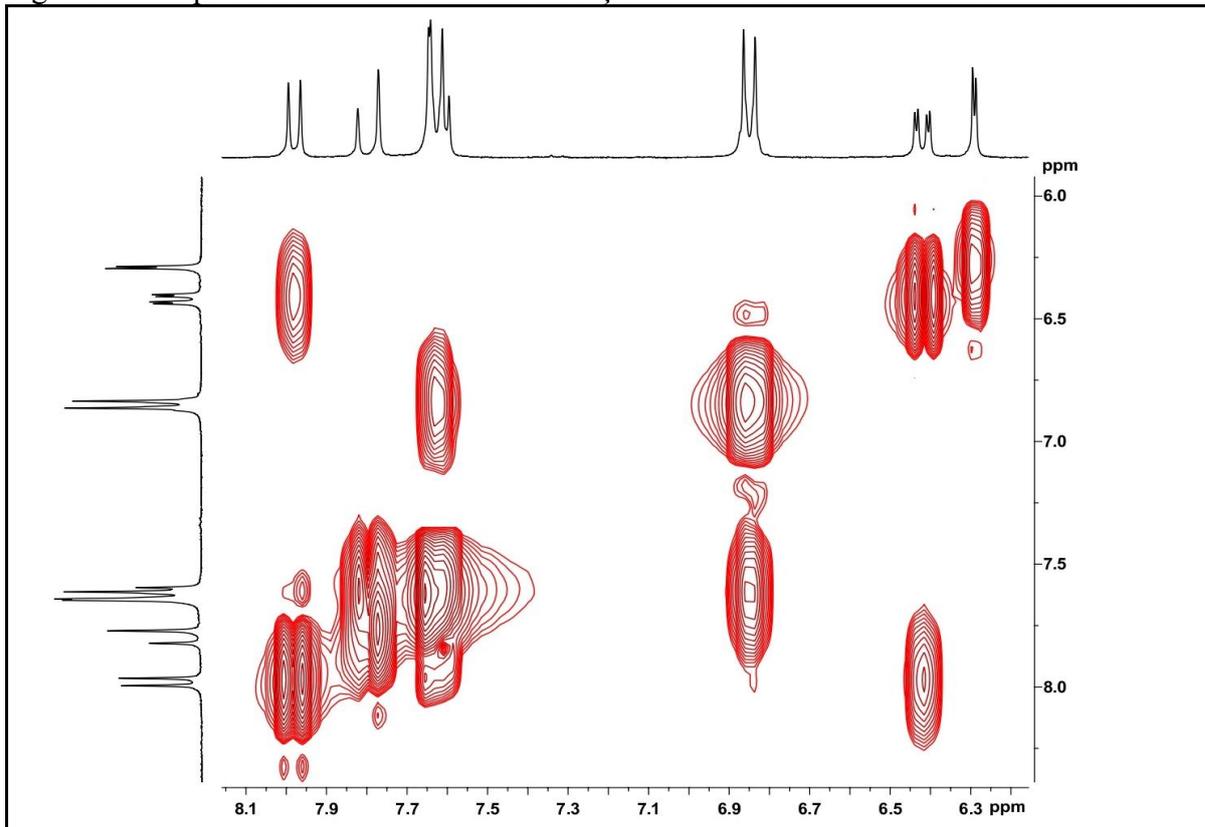


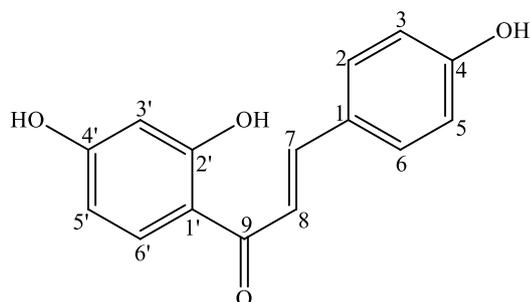
Figura 54 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de **BPC-7**



Fonte: o próprio autor.

Através dos dados espectroscópicos apresentados e a posterior comparação com dados registrados na literatura (KHAMSAN *et al.*, 2012, Tabela 8, pág. 80) foi possível identificar **BPC-7** como um flavonoide pertencente à classe das chalconas denominado 2',4',4-triidroxichalcona, conhecido como isoliquiritigenina (Figura 55, pág. 80). Essa chalcona já foi isolada de algumas espécies de *Bauhinia* tais como *B. manca* (ACHENBACH, 1988), *B. sirindhorniae* (ATHIKOMKULCHAI; SRIUBOLMAS; RUANGRUNGSI, 2005) e *B. glauca* subsp. *pernevosa* (WU *et al.*, 2009) e está sendo relatada pela primeira vez na espécie *B. pentandra*. Vale ressaltar que essa substância apresenta diversas atividades biológicas, tais como antitumoral, antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória, hepatoprotetora (ZHANG *et al.*, 2018a) e antidiabética (GAUR *et al.*, 2014).

Figura 55 – Estrutura da isoliquiritigenina



Fonte: o próprio autor.

Tabela 8 – Dados espectroscópicos de **BPC-7** comparados com os dados descritos na literatura (KHAMASAN *et al.*, 2012) para a 2',4',4'-trihidroxichalcona (isoliquiritigenina)

	BPC-7 (CD₃OD)		HMBC		Literatura (CD₃OD)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., <i>J</i> Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., <i>J</i> Hz)
C						
1	128,02	-		H-3/5; H-8	127,8	-
4	161,74	-	H-3/5	H-2/6	161,8	-
9	193,71	-	H-8	H-7; H-6'	192,7	-
1'	114,87	-		H-3'; H-5'	113,6	-
2'	166,59	-			167,8	-
4'	167,67	-		H-6'	169,7	-
CH						
2	131,98	7,63 (d; 8,8)		H-7	131,7	7,59 (d; 8,6)
3	117,09	6,85 (d; 8,6)			117,0	6,83 (d; 8,6)
5	117,09	6,85 (d; 8,6)			117,0	6,83 (d; 8,6)
6	131,98	7,63 (d; 8,8)		H-7	131,7	7,59 (d; 8,6)
7	145,81	7,80 (d; 15,4)	H-8	H-2/6	145,0	7,74 (d; 15,4)
8	118,53	7,62 (d; 15,4)	H-7		118,5	7,58 (d; 15,4)
3'	103,98	6,29 (d; 2,4)			104,4	6,20 (d; 2,4)
5'	109,32	6,42 (dd; 8,9; 2,3)			110,8	6,35 (dd; 9,0; 2,4)
6'	133,53	7,98 (d; 8,9)			133,2	7,90 (d; 9,0)
2'-OH	-	-			-	-
4'-OH	-	-			-	-
4-OH	-	-			-	-

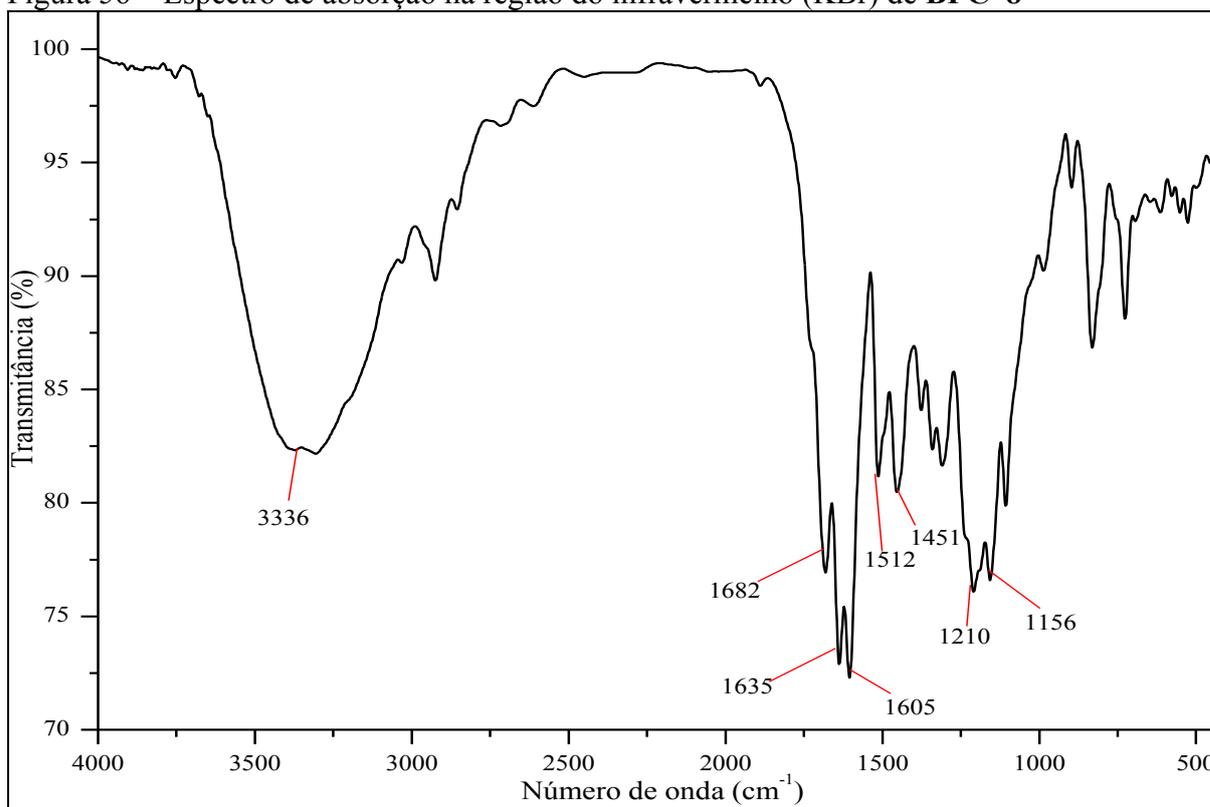
Fonte: o próprio autor.

5.1.8 Determinação estrutural de BPC-8

A metodologia descrita no item 6.4.1.13 (pág. 123) resultou no isolamento de um sólido amorfo de coloração amarela (14,5 mg), solúvel em metanol, com ponto de fusão na faixa de 180–181 °C, literatura: p.f. = 217,0 °C (IINUMA *et al.*, 1991), que foi designado de **BPC-8**.

O espectro de absorção na região do infravermelho (IV) de **BPC-8** (Figura 56) exibiu uma banda centrada em 3336 cm^{-1} característica de deformação axial de ligação O–H. Adicionalmente, o espectro revelou uma banda em 1682 cm^{-1} atribuída à deformação axial de ligação C=O, além de quatro bandas de absorção relacionadas à deformação axial de ligação C=C de anel aromático em 1635, 1605, 1512 e 1451 cm^{-1} . O espectro também apresentou duas bandas inferidas à deformação axial de ligação C–O em 1210 cm^{-1} e 1156 cm^{-1} (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA *et al.*, 2015).

Figura 56 – Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de **BPC-8**

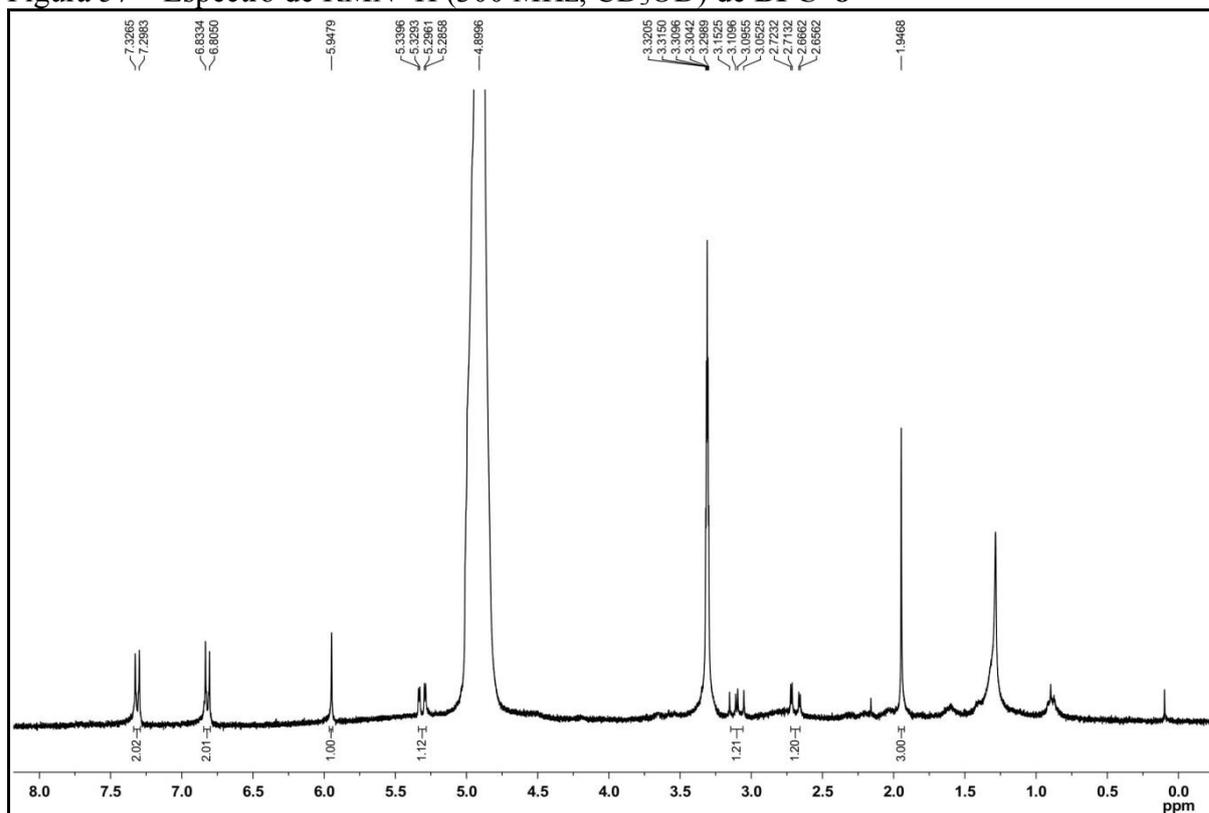


Fonte: o próprio autor.

O espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD , Figura 57, pág. 82) de **BPC-8**, em comparação com **BPC-6** (Figura 44, pág. 70), permitiu observar a presença de um simpleto em δ_{H} 5,95 com integração para um hidrogênio, indicando que houve a ausência de um

hidrogênio com relação à estrutura de **BPC-6**. Essa hipótese também foi confirmada pelo aparecimento de um sinal em δ_H 1,95 (3H; s) no espectro de hidrogênio de **BPC-8**, confirmando a presença de grupo metila ligado ao anel aromático. O espectro também mostrou dois dupletos relacionados a hidrogênios de anel aromático *orto* posicionados em um sistema *para* substituído em δ_H 7,31 (2H; d; $J = 8,5$ Hz) e δ_H 6,82 (2H; d; $J = 8,5$ Hz). Vale ressaltar que esses sinais foram confirmados por meio dos deslocamentos químicos, integrações e constantes de acoplamento. Adicionalmente, foram observados os sinais em δ_H 3,10 (1H; dd; $J = 17,1$ e $12,9$ Hz) e δ_H 2,69 (1H; $J = 17,1$ e $3,0$ Hz) relacionados a hidrogênios ligados a carbono metilênico. Por fim, o espectro exibiu dois sinais, sendo um em δ_H 5,95 (1H; s) e o outro em δ_H 5,31 (1H; dd; $J = 13,0$ e $3,1$ Hz), atribuídos a hidrogênio ligado a anel aromático pentassubstituído e a carbono oxigenado, respectivamente (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA *et al.*, 2015).

Figura 57 – Espectro de RMN 1H (300 MHz, CD_3OD) de **BPC-8**

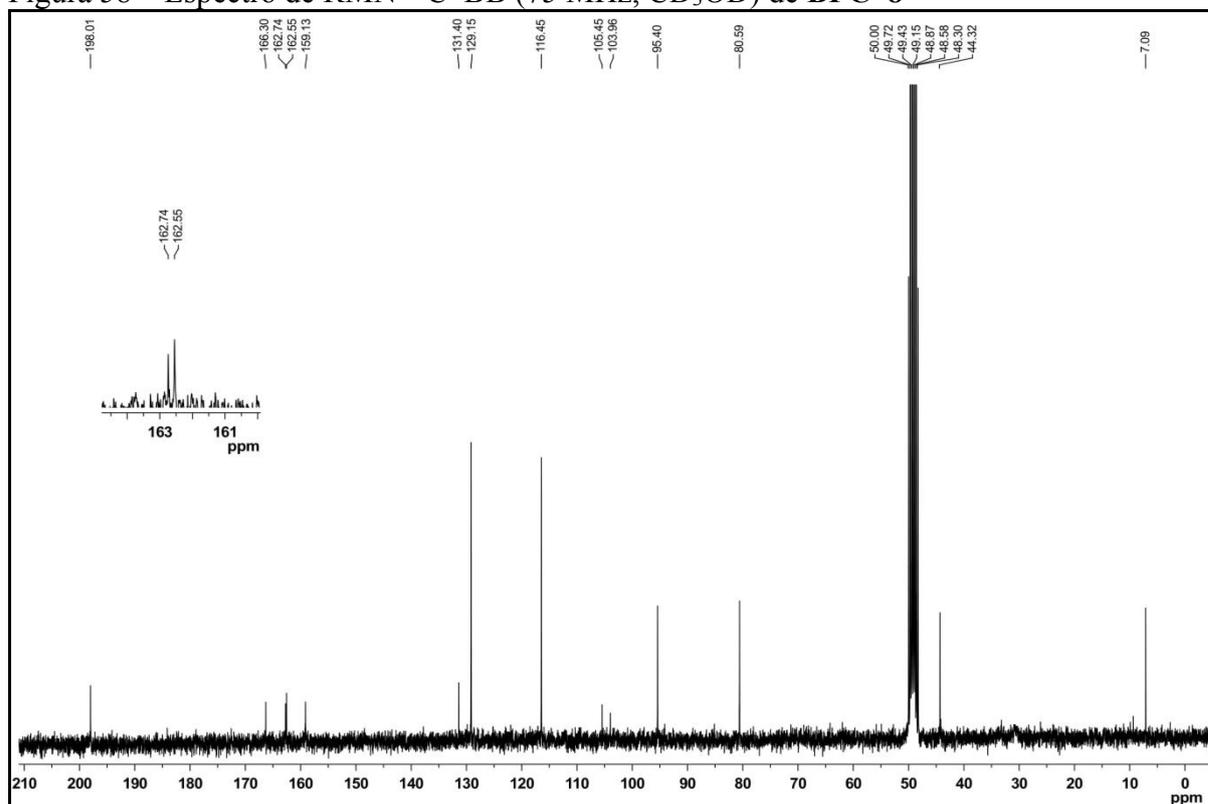


Fonte: o próprio autor.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CD_3OD , Figura 58, pág. 83) de **BPC-8** apresentou 14 linhas espectrais. Os espectros de RMN ^{13}C -BB de **BPC-8** e de **BPC-6** (Figura 45, pág. 71) mostraram-se semelhantes, tendo como diferença a presença de um sinal em δ_C 7,09, correspondente a carbono metílico. O espectro de **BPC-8** exibiu cinco sinais mais

desprotegidos em δ_C 198,01, δ_C 166,30, δ_C 162,74, δ_C 162,55 e δ_C 159,13 associados a carbonos oxigenados e dentre esses, um sinal para carbono de carbonila em δ_C 198,01. Vale destacar que os sinais em δ_C 129,15 e δ_C 116,45 foram atribuídos a dois átomos de carbono cada, devido às suas intensidades. Além disso, o espectro mostrou sinais relativos a carbonos oximetínico e metilênico em δ_C 80,59 e δ_C 44,32, respectivamente. Através da comparação dos dados espectroscópicos de **BPC-8** e **BPC-6**, bem como dados descritos na literatura, foi possível construir a Tabela 9 (pág. 87).

Figura 58 – Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CD_3OD) de **BPC-8**

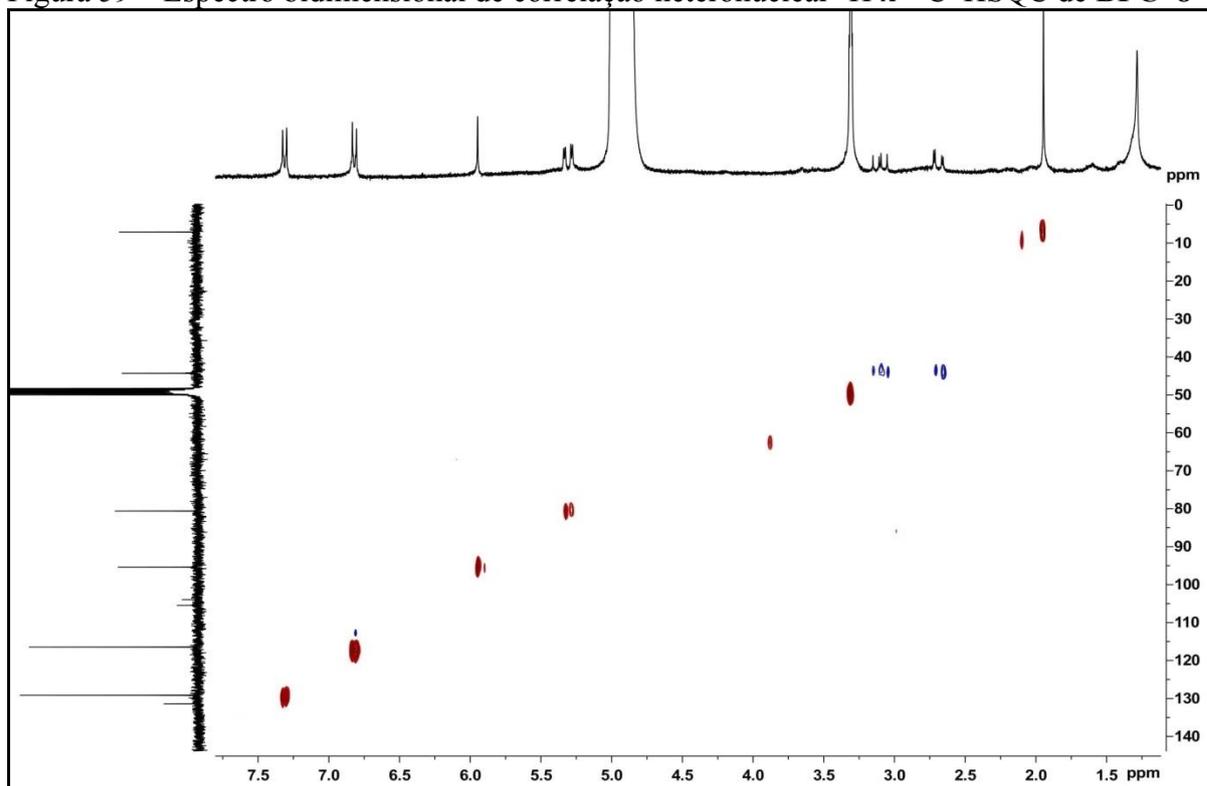


Fonte: o próprio autor.

A partir da análise dos dados espectroscópicos de **BPC-8** foi proposta a fórmula molecular $C_{16}H_{14}O_5$, cujo índice de deficiência de hidrogênio (IDH) é igual a dez. Vale salientar a presença de sinais em δ_C 198,01 (C-4), δ_C 80,59 (C-2) e δ_C 44,32 (C-3) associados a carbonos carbonílico, oximetínico e metilênico, respectivamente. Portanto, esses sinais podem ser um indicativo de um possível esqueleto básico de uma flavanona, conforme citado anteriormente (Figura 38, pág. 63).

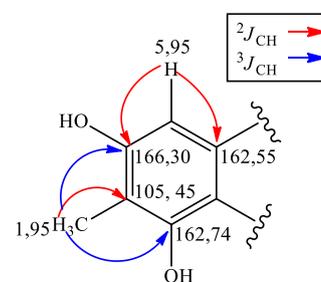
O espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1H \times ^{13}C$ -HSQC (Figura 59, pág. 84) possibilitou a associação direta entre todos os sinais de hidrogênios aos seus respectivos átomos de carbonos, conforme mostrado na Tabela 9 (pág. 87).

Figura 59 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HSQC de **BPC-8**

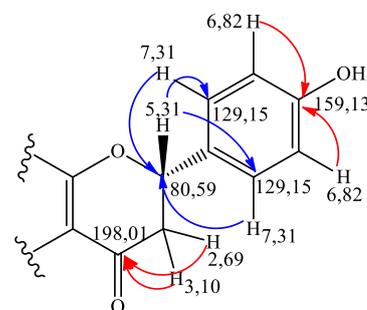


Fonte: o próprio autor.

As posições dos substituintes no anel A de **BPC-8** foram definidas através da análise de seu espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$ -HMBC (Figura 60, pág. 85). Verificou-se as correlações a duas ligações ($^2J_{\text{CH}}$) entre os hidrogênios em δ_{H} 1,95 (H_3C -6) e o carbono em δ_{C} 105,45 (C-6), além de correlações a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) com os carbonos em δ_{C} 162,74 (C-5) e δ_{C} 166,30 (C-7), fixando assim, a posição da metila entre as duas hidroxilas. O espectro também mostrou as correlações a duas ligações do hidrogênio em δ_{H} 5,95 (H-8) com os carbonos em δ_{C} 166,30 (C-7) e δ_{C} 162,55 (C-8a).

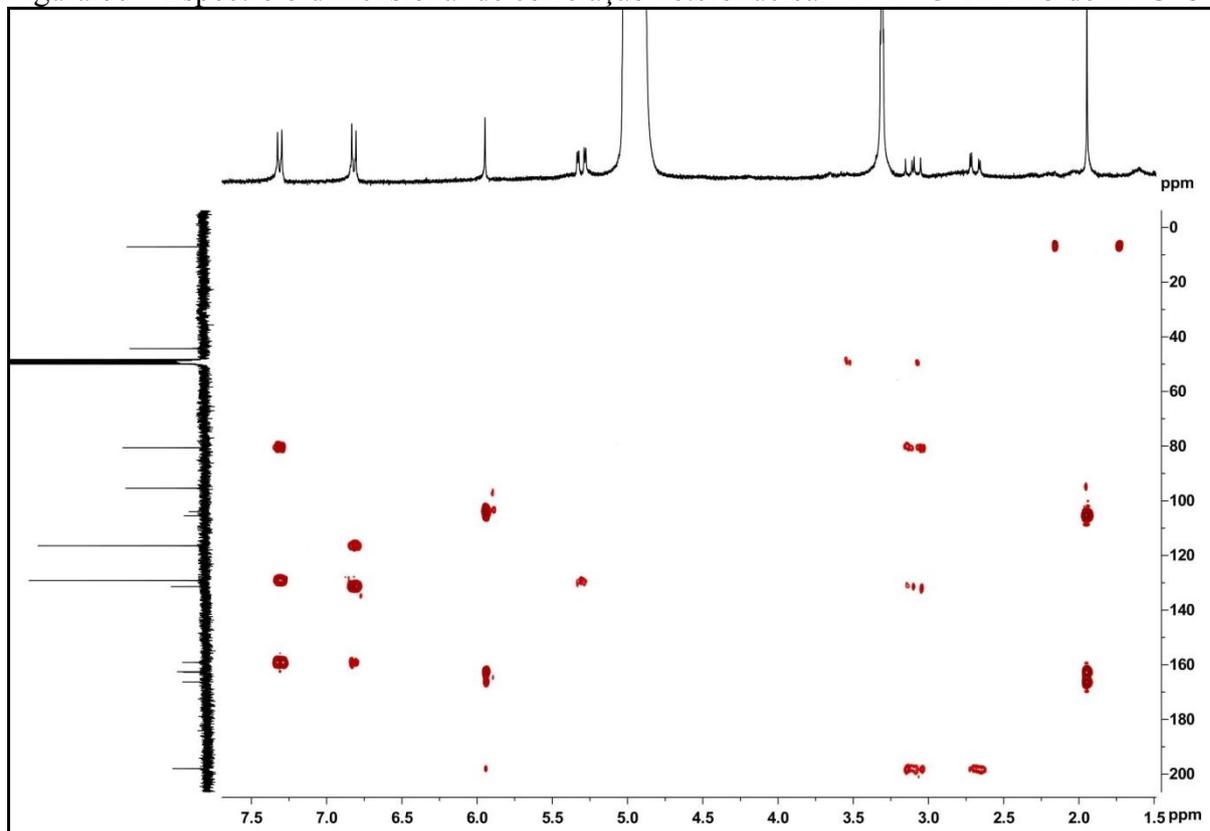


Adicionalmente, foram observadas as correlações relacionadas aos hidrogênios dos anéis B e C. Os hidrogênios em δ_{H} 3,10 (H-3) e δ_{H} 2,69 (H-3) correlacionaram a duas ligações com o carbono em δ_{C} 193,70 (C-4). O espectro apresentou correlações que definiram a posição da hidroxila no anel C, sendo elas a $^3J_{\text{CH}}$ dos hidrogênios em 5,31 (H-2) com os



carbonos em δ_C 129,15 (C-2'/6'), a $^3J_{CH}$ dos hidrogênios em δ_H 7,31 (H-2'/6') com o carbono em δ_C 80,59 (C-2) e a $^2J_{CH}$ dos hidrogênios em δ_H 6,82 (H-3'/5') com o carbono em δ_C 159,13 (C-4').

Figura 60 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1H \times ^{13}C$ -HMBC de **BPC-8**



Fonte: o próprio autor.

O espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1H \times ^1H$ -COSY (Figura 61, pág. 86) de **BPC-8** exibiu correlações entre os hidrogênios em δ_H 5,31 (H-2) e δ_H 3,10 (H-3), além de correlações entre os hidrogênios em δ_H 3,10 (H-3) e δ_H 2,69 (H-3). Adicionalmente, foram observadas correlações entre os hidrogênios em posições *orto* em δ_H 7,31 (H-2'/6') e δ_H 6,82 (H-3'/5'), confirmando os sistemas propostos.

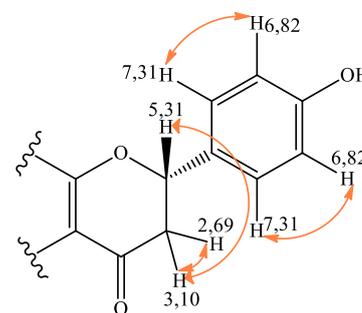
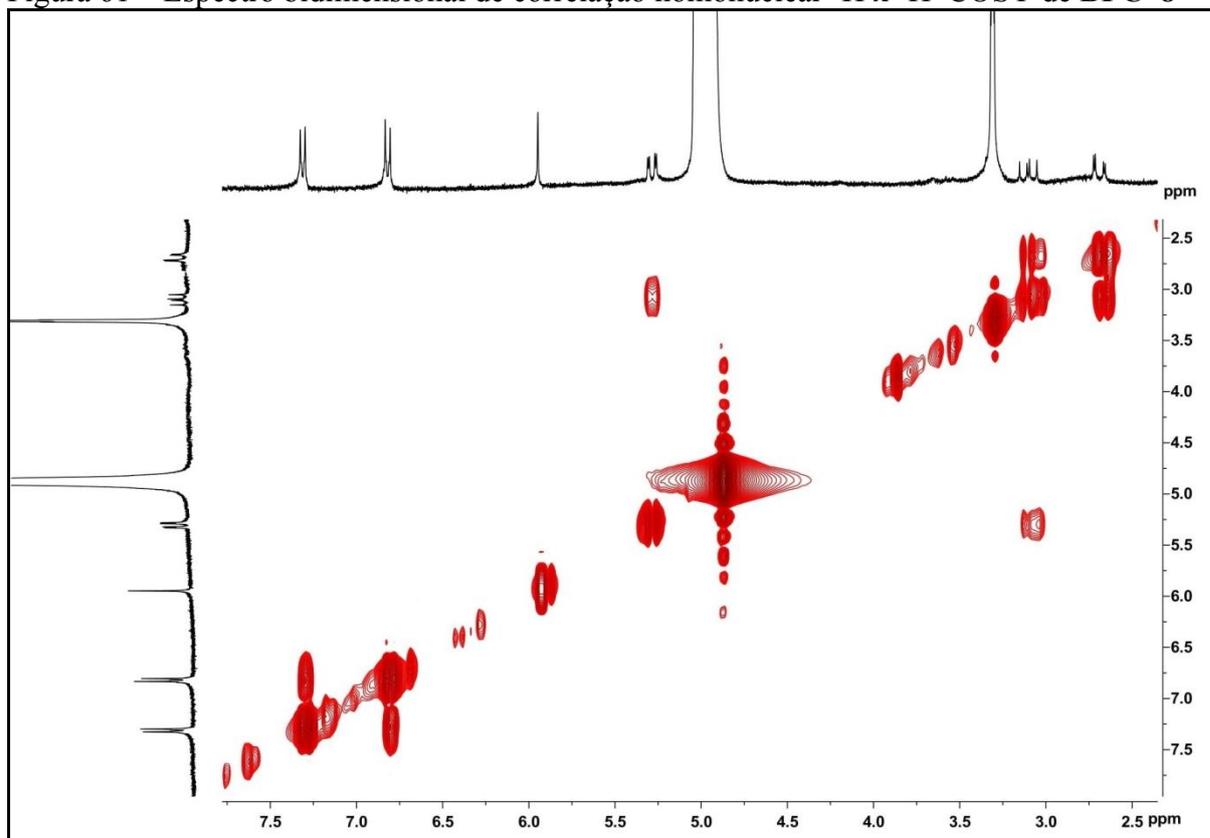


Figura 61 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de **BPC-8**

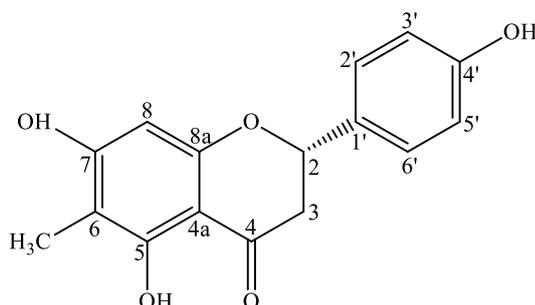


Fonte: o próprio autor.

A definição da estereoquímica relativa do carbono C-2 foi definida do mesmo modo que em **BPC-5** e está descrita no item 5.1.5 (pág. 60).

Através dos dados espectroscópicos obtidos e posterior comparação com dados descritos na literatura (NOBAKHT *et al.*, 2014) (Tabela 9, pág. 87) foi possível identificar **BPC-8** como o flavonoide da classe das flavanonas denominado 6-metil-5,7,4'-triidroxiflavanona (Figura 62, pág. 87), trivialmente conhecido como poriol. Na literatura foi encontrado apenas registro da atividade antifúngica desse composto frente a *Poria weirii* (WALLIS; REYNOLDS, 1965) e está sendo descrito pela primeira vez no gênero *Bauhinia*.

Figura 62 – Estrutura do poriol



Fonte: o próprio autor.

Tabela 9 – Dados espectroscópicos de **BPC-8** comparados com os dados descritos na literatura (NOBAKHT *et al.*, 2014) para a 6-metil-5,7,4'-trihidroxi-flavanona (poriol)

	BPC-8 (CD₃OD)		HMBC		Literatura (DMSO)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., <i>J</i> Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., <i>J</i> Hz)
C						
4	198,01	-	H-3		194,3	-
4a	103,96	-		H-8	100,6	-
5	162,74	-		H ₃ C-6	160,4	-
6	105,45	-	H ₃ C-6		103,3	-
7	166,30	-	H-8	H ₃ C-6	168,8	-
8a	162,55	-	H-8		160,2	-
1'	131,40	-			129,2	-
4'	159,13	-	H-3'/5'	H-2'/6'	157,5	-
CH						
2	80,59	5,31 (dd; 13,0; 3,1)	H-3	H-2'/6'	77,9	5,32 (dd; 12,4; 2,8)
8	95,40	5,95 (s)			94,9	5,82 (s)
2'	129,15	7,31 (d; 8,5)		H-2	128,0	7,29 (d; 8,3)
3'	116,45	6,82 (d; 8,5)			115,0	6,77 (d; 8,3)
5'	116,45	6,82 (d; 8,5)			115,0	6,77 (d; 8,3)
6'	129,15	7,31 (d; 8,5)		H-2	128,0	7,29 (d; 8,3)
CH₂						
3	44,32	3,10 (dd; 17,1; 12,9) 2,69 (dd; 17,1; 3,0)			42,0	A 3,12 (dd; 17,0; 12,4) B 2,60 (dd; 17,0; 2,8)
CH₃						
H ₃ C-6	7,09	1,95 (s)			7,1	1,83 (s)
5-OH	-	-			-	-
7-OH	-	-			-	-
4'-OH	-	-			-	-

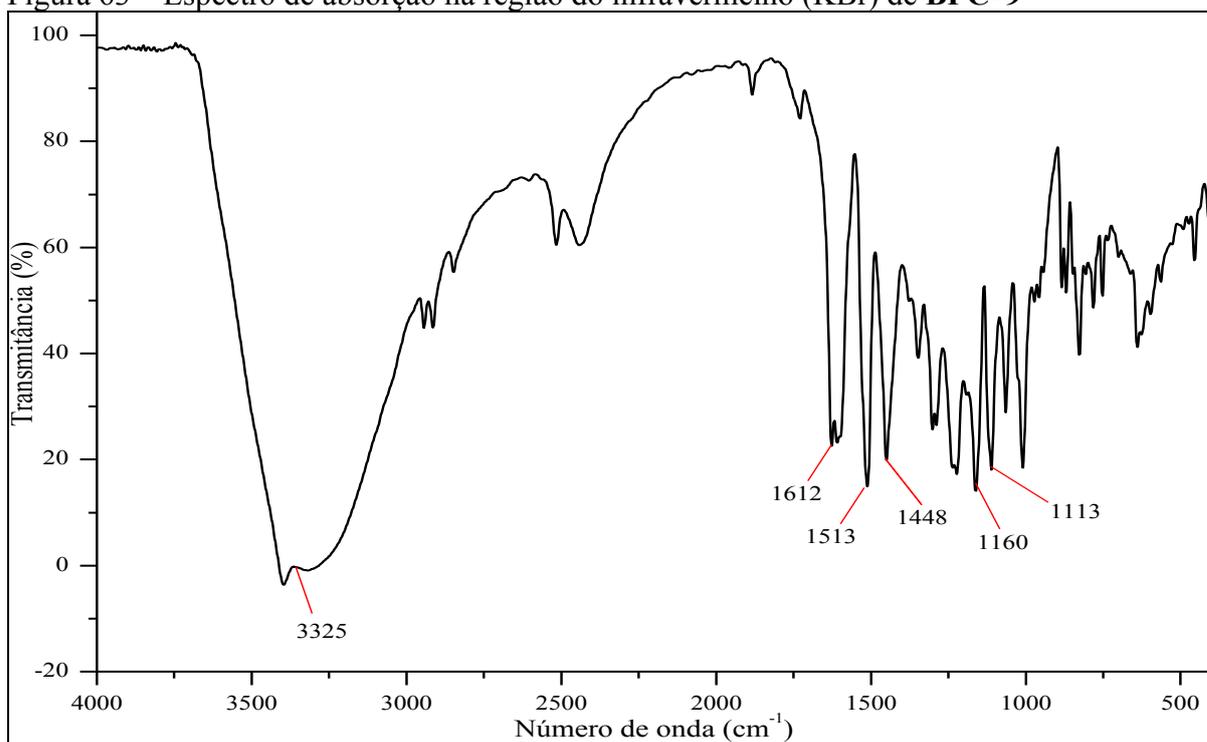
Fonte: o próprio autor.

5.1.9 Determinação estrutural de BPC-9

Através do procedimento relatado no item 6.4.1.17 (pág. 127) obteve-se um sólido amorfo avermelhado (95,5 mg), solúvel em metanol, com ponto de fusão na faixa de 191–192 °C, literatura: p.f.= 208–209 °C (SURESH *et al.*, 2012), que foi designado de **BPC-9**.

O espectro de absorção na região do infravermelho (IV) de **BPC-9** (Figura 63) mostrou uma banda centrada em 3325 cm⁻¹ correspondente à deformação axial de ligação O–H, além de bandas de absorção em 1612, 1513 e 1448 cm⁻¹ relacionadas à deformação axial de ligação C=C de anel aromático. O espectro ainda exibiu duas bandas em 1160 cm⁻¹ e 1113 cm⁻¹ características de deformação axial de ligação C–O (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA *et al.*, 2015).

Figura 63 – Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de **BPC-9**

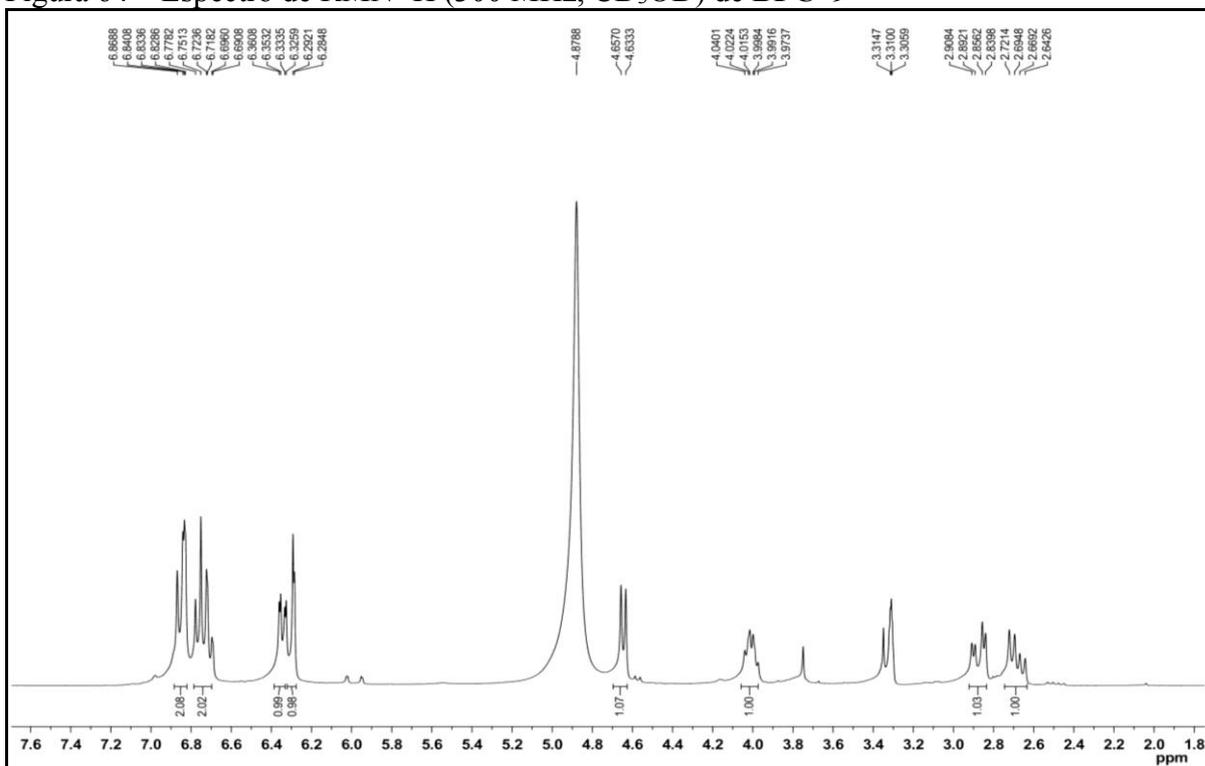


Fonte: o próprio autor.

O espectro de RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD, Figura 64, pág. 89) de **BPC-9** apresentou sinais na região entre δ_H 6,28–6,87, confirmando a presença de hidrogênios ligados a carbonos de anel aromático. Vale destacar os sinais em δ_H 6,85 (1H; d; J = 8,4 Hz) e δ_H 6,76 (1H; d; J = 8,1 Hz) relacionados a hidrogênios *orto* posicionados, além de sinais em δ_H 6,83 (1H; d; J = 1,5 Hz) e δ_H 6,29 (1H; d; J = 2,2 Hz) atribuídos a hidrogênios em posição *meta*. Observaram-se também os sinais em δ_H 6,71 (1H; dd; J = 8,3 e 1,6 Hz) e δ_H 6,34 (1H;

dd; $J = 8,2$ e $2,3$ Hz), que de acordo com as magnitudes das constantes de acoplamento, foram atribuídos a hidrogênios em posições *orto* e *meta*. Adicionalmente, o espectro mostrou um duplete em δ_H 4,65 (1H; *d*; $J = 7,1$ Hz) e um tripleto em δ_H 4,01 (m) assinalando a presença de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados. Esse espectro revelou ainda dois dupletos que indicaram a presença de hidrogênios benzílicos em δ_H 2,87 (1H; dd; $J = 15,7$ e $4,9$ Hz) e δ_H 2,68 (1H; dd; $J = 15,7$ e $8,0$ Hz) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA *et al.*, 2015).

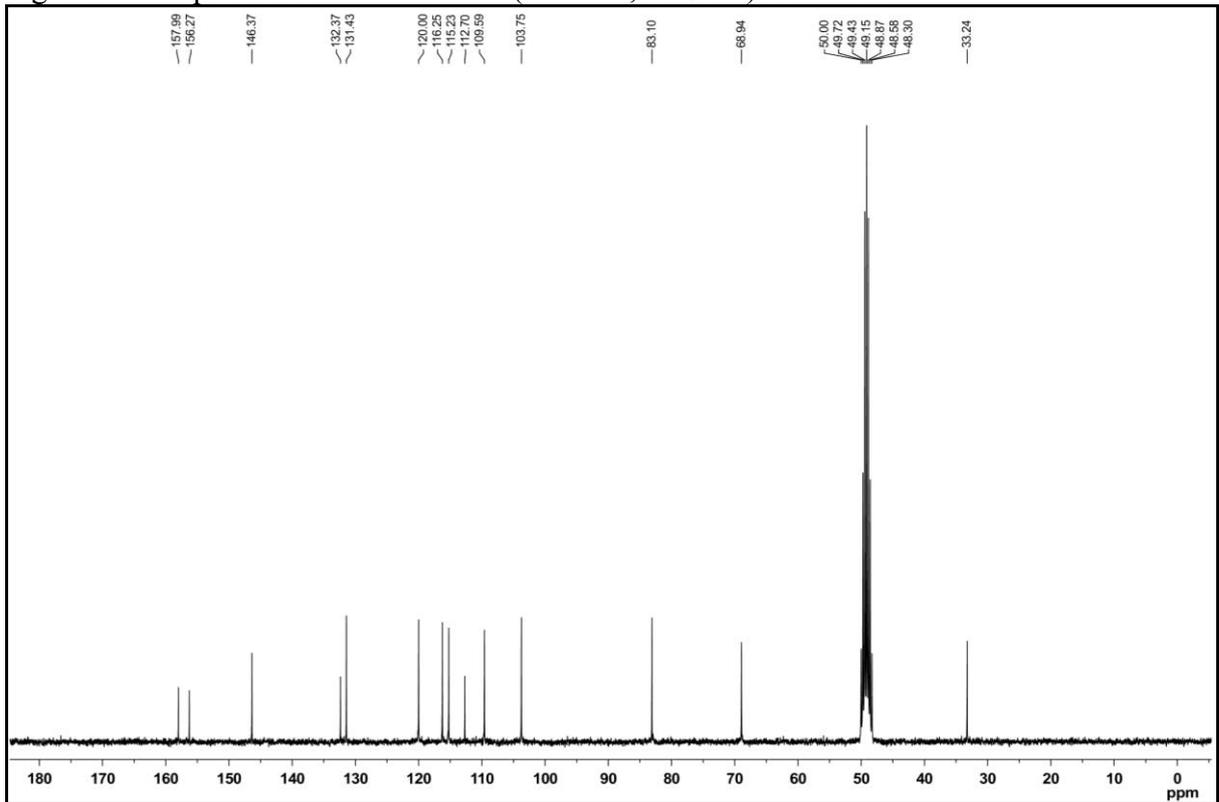
Figura 64 – Espectro de RMN 1H (300 MHz, CD_3OD) de **BPC-9**



Fonte: o próprio autor.

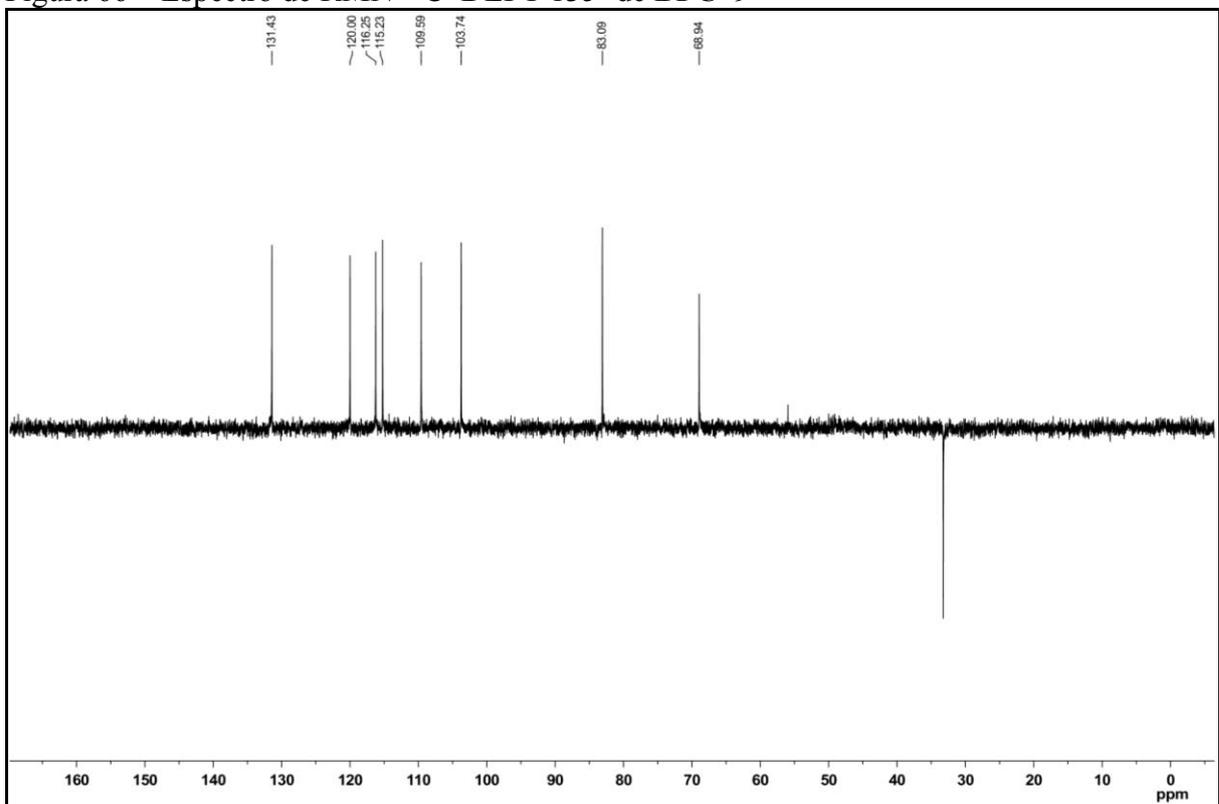
No espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CD_3OD , Figura 65, pág. 90) de **BPC-9** foi possível detectar a presença de 14 linhas espectrais, sendo três sinais mais desprotegidos em δ_C 157,99, δ_C 156,27 e δ_C 146,37 associados a carbonos sp^2 oxigenados. Vale destacar que dentre os sinais correspondentes a carbonos não hidrogenados, o sinal em δ_C 146,37 foi relacionado a dois átomos de carbono devido à sua intensidade. A análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C -BB e ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CD_3OD , Figura 66, pág. 90) possibilitou a identificação de seis carbonos não hidrogenados (C), oito carbonos metínicos (CH) e um carbono metilênico (CH_2), conforme apresentado na Tabela 10 (pág. 95).

Figura 65 – Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CD_3OD) de **BPC-9**



Fonte: o próprio autor.

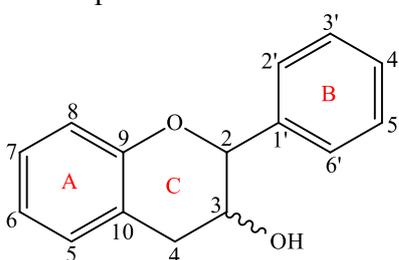
Figura 66 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de **BPC-9**



Fonte: o próprio autor.

A análise dos dados espectroscópicos de **BPC-9** permitiu sugerir a fórmula molecular $C_{15}H_{14}O_5$, tendo índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a nove. A caracterização estrutural desse composto foi definida através de alguns sinais importantes que permitiram identificar o composto como sendo um flavonoide do tipo flavan-3-ol, cujo esqueleto básico está apresentado na Figura 67. Vale destacar a presença de dois sinais para carbonos oximetínicos em δ_C 83,10 (C-2) e δ_C 68,94 (C-3), bem como um sinal para carbono metilênico em δ_C 33,24 (C-4), além da ausência de um sinal para carbono carbonílico.

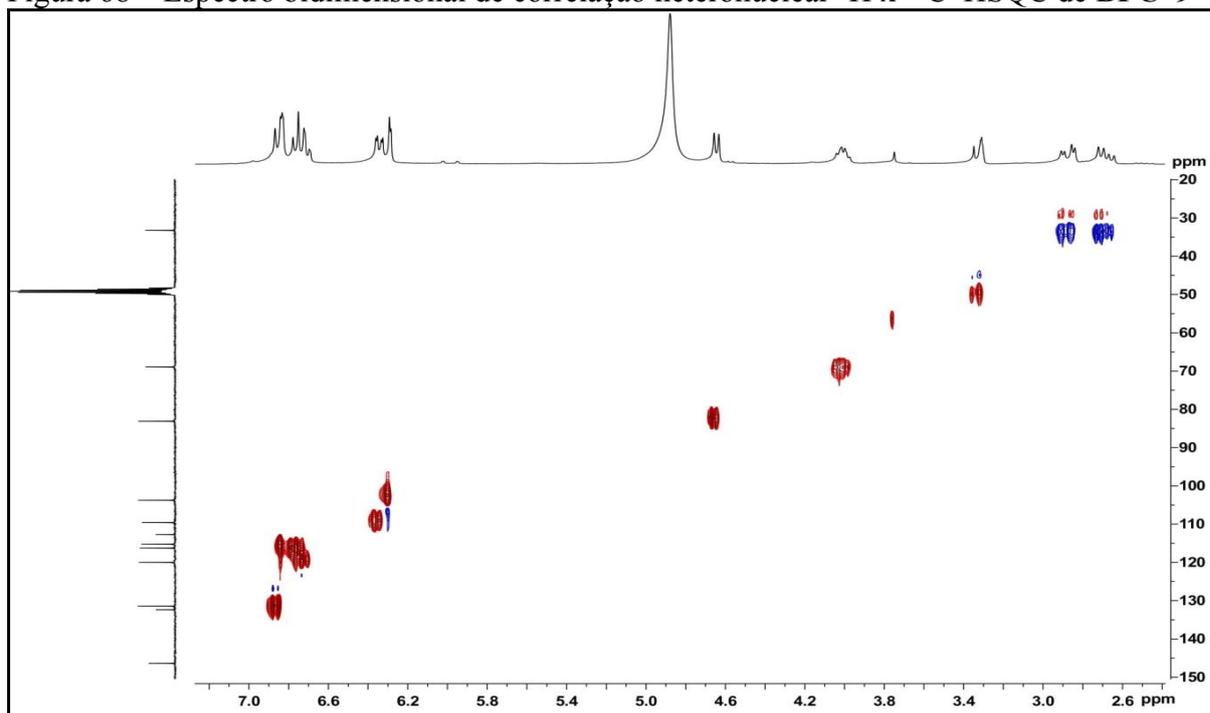
Figura 67 – Esqueleto básico de um flavan-3-ol



Fonte: o próprio autor.

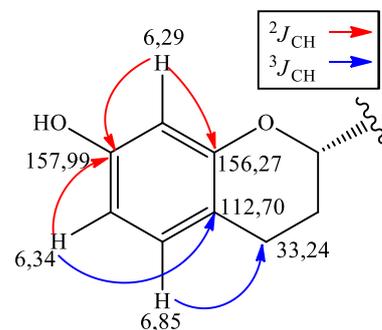
O espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1H \times ^{13}C$ -HSQC (Figura 68), possibilitou fazer a associação direta entre os hidrogênios e carbonos de **BPC-9**, conforme mostrado na Tabela 10 (pág. 95).

Figura 68 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1H \times ^{13}C$ -HSQC de **BPC-9**

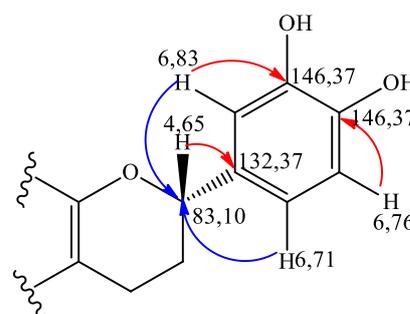


Fonte: o próprio autor.

O espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$ -HMBC de **BPC-9** (Figura 69, pág. 93) possibilitou identificar as correlações que definiram as posições dos substituintes no esqueleto básico da flavan-3-ol. As correlações dos hidrogênios do anel A, colaboraram para fixar a posição da hidroxila. O hidrogênio em δ_{H} 6,29 (H-8) correlacionou a duas ligações ($^2J_{\text{CH}}$) com os carbonos em δ_{C} 157,99 (C-7) e δ_{C} 156,27 (C-9). Observou-se também correlações a $^2J_{\text{CH}}$ e a $^3J_{\text{CH}}$ do hidrogênio em δ_{H} 6,34 (H-6) com os carbonos em δ_{C} 157,99 (C-7) e δ_{C} 112,70 (C-10), respectivamente. Adicionalmente, o hidrogênio em δ_{H} 6,85 (H-5) correlacionou a três ligações com o carbono em δ_{C} 33,24 (C-10).



As posições das hidroxilas no anel B foram definidas por meio das correlações a três e a duas ligações do hidrogênio em δ_{H} 6,83 (H-2') com os carbonos em δ_{C} 83,10 (C-2) e δ_{C} 146,37 (C-3'), respectivamente; correlação a duas ligações do hidrogênio em δ_{H} 6,76 (H-5') com o carbono em δ_{C} 146,37 (C-4'); correlações a três ligações dos hidrogênios em δ_{H} 6,87 (H-2') e δ_{H} 6,71 (H-6') com o carbono em δ_{C} 83,10 (C-2). Além disso, o hidrogênio em δ_{H} 4,65 (H-2) correlacionou-se a $^2J_{\text{CH}}$ com o carbono em δ_{C} 132,37 (C-1').



No espectro, observaram-se também as correlações no anel central. Os hidrogênios em δ_{H} 2,68 (H-4) e δ_{H} 2,87 (H-4) correlacionaram a duas ligações ($^2J_{\text{CH}}$) com os carbonos em δ_{C} 68,94 (C-3) e δ_{C} 112,70 (C-10). Adicionalmente, o hidrogênio em δ_{H} 4,65 (H-2) correlacionou a duas e três ligações com os carbonos em δ_{C} 68,94 (C-3) e δ_{C} 33,24 (C-4), respectivamente.

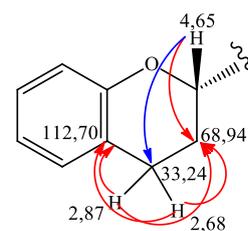
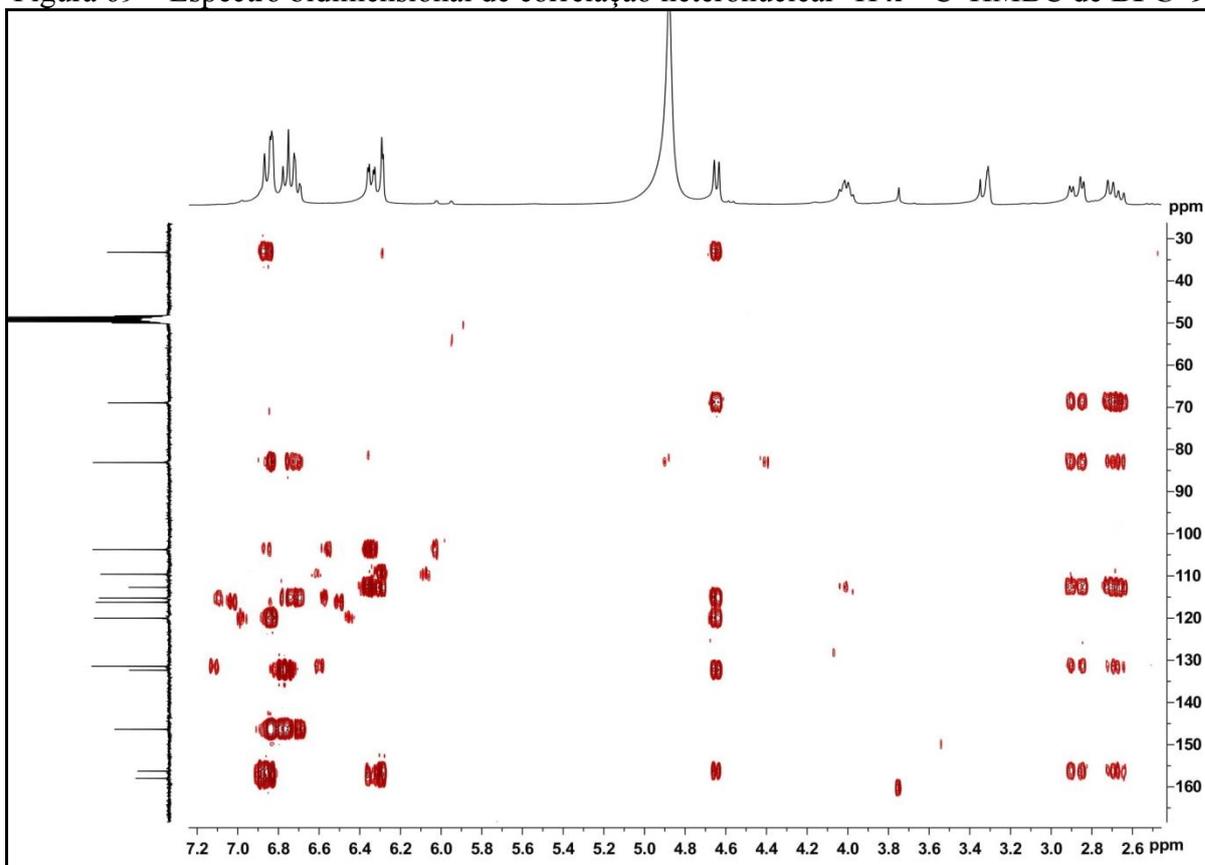


Figura 69 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de **BPC-9**



Fonte: o próprio autor.

O espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (Figura 70, pág. 94) de **BPC-9** mostrou as correlações entre os hidrogênios em δ_{H} 4,65 (H-2) e δ_{H} 4,01 (H-3), além de correlações do hidrogênio H-3 em δ_{H} 4,01 com os hidrogênios H-4 em δ_{H} 2,68 e δ_{H} 2,87. Vale ressaltar que os hidrogênios H-4 (δ_{H} 2,68 e δ_{H} 2,87) se correlacionaram. Outra correlação também foi observada entre os hidrogênios *ortho* posicionados em δ_{H} 6,85 (H-5) e δ_{H} 6,34 (H-6). Essas correlações contribuíram para confirmar os sistemas propostos da estrutura química de **BPC-9**.

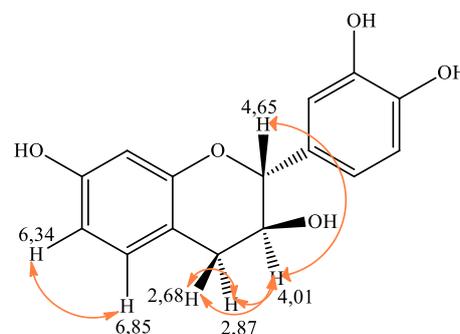
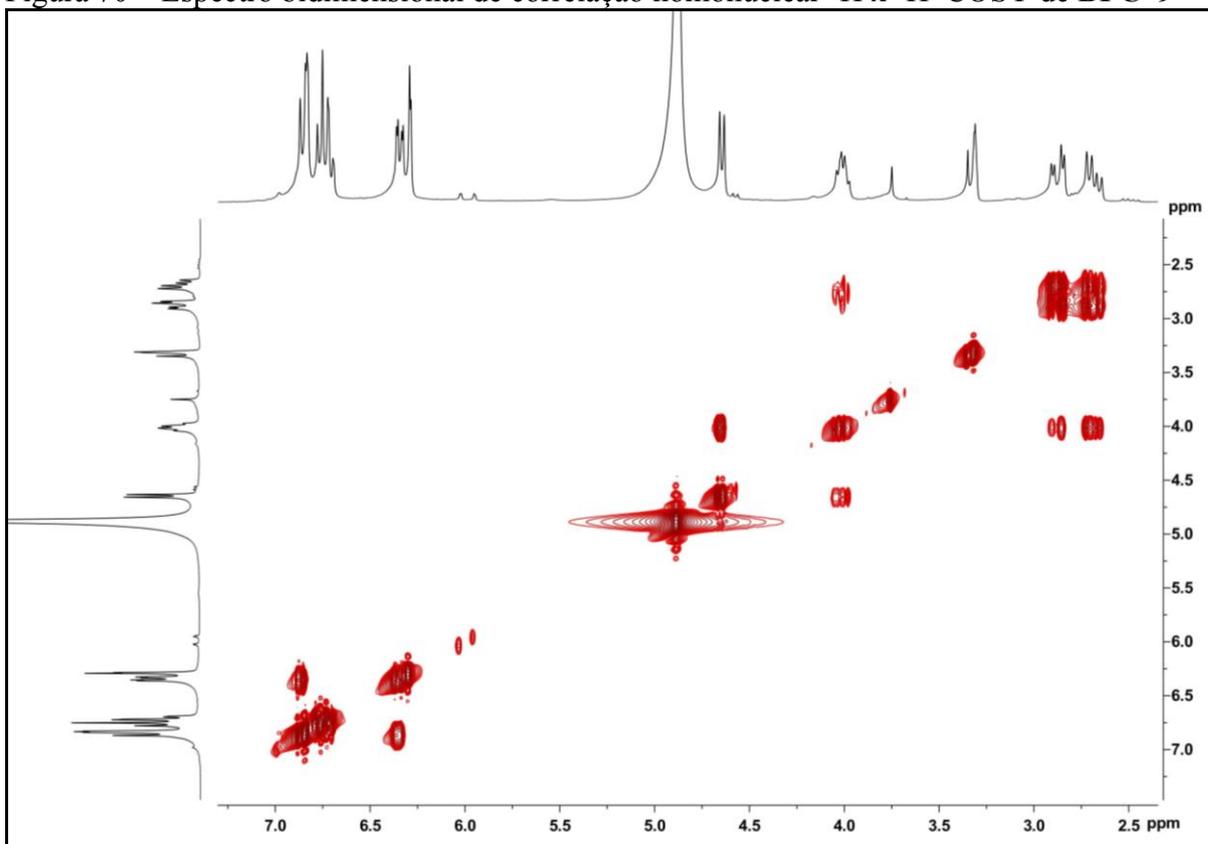
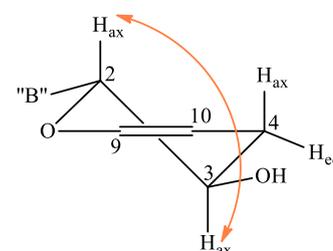


Figura 70 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de **BPC-9**



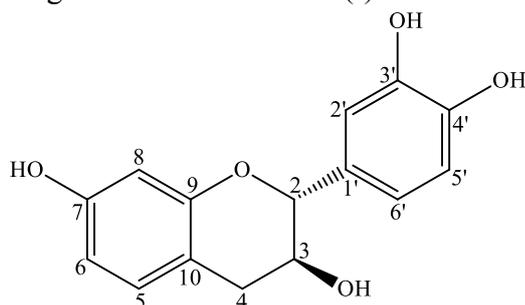
Fonte: o próprio autor.

A posição *trans-diaxial* dos hidrogênios H-2_{ax} e H-3_{ax} foi definida com base no valor da constante de acoplamento ($J_{2,3} = 7,1 \text{ Hz}$) característica de configuração relativa 2,3-*trans* ligados aos carbonos C-2 e C-3 (2*R*,3*S* ou 2*S*, 3*R*) (ZOCOLER *et al.*, 2009). Portanto, o grupo fenila (anel "B"), pode está em posição *pseudoequatorial*.



A análise dos dados espectroscópicos analisados e a posterior comparação com dados registrados na literatura (COSTA *et al.*, 2014; Tabela 10, pág. 95) permitiram identificar **BPC-9** como o flavonoide da classe das flavanas-3-ol, denominado 2-(3',4'-dihidroxifenil)-cromano-3,7-diol, conhecido vulgarmente como (-)-fisetinidol (Figura 71, pág. 95). Vale ressaltar que essa substância já foi isolada anteriormente de algumas espécies do gênero *Bauhinia*, tais como *B. acuruana* (GÓIS *et al.*, 2017), *B. pulchella* (CARVALHO, 2014), *B. unguata* (SOUSA *et al.*, 2016) e *B. cheilantha* (SILVA, 2018), no entanto, está sendo relatada pela primeira vez em *B. pentandra*. Estudos mostraram que o (-)-fisetinidol apresenta atividade antioxidante (IMAI *et al.*, 2008) e efeito antiperiodontal (PINTO, 2019).

Figura 71 – Estrutura do (-)-fisetinidol



Fonte: o próprio autor.

Tabela 10 – Dados espectroscópicos de **BPC-9** comparados com os dados descritos na literatura (COSTA *et al.*, 2014) para o (-)-fisetinidol

	BPC-9 (CD ₃ OD)		HMBC		Literatura (CD ₃ OD)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., <i>J</i> Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., <i>J</i> Hz)
C						
7	157,99	-		H-5	157,9	-
9	156,27	-	H-8		156,2	-
10	112,70	-	2H-4	H-3; H-6; H-8	112,5	-
1'	132,37	-	H-2	H-5'	132,2	-
3'	146,37	-	H-2'		146,3	-
4'	146,37	-	H-5'	H-2'; H-6'	146,3	-
CH						
2	83,10	4,65 (d; 7,1)		H-2'; 2H- 4; H-6'	83,0	4,63 (d; 7,2)
3	68,94	4,01 (m)	H-2; 2H-4		68,8	3,99 (ddd; 7,8; 7,2; 5,1)
5	131,43	6,85 (d; 8,4)		2H-4	131,3	6,85 (d; 8,1)
6	109,59	6,34 (dd; 8,2; 2,3)		H-8	109,4	6,33 (dd; 8,1; 2,4)
8	103,75	6,29 (d; 2,2)		H-6	103,6	6,27 (d; 2,4)
2'	115,23	6,83 (d; 1,5)		H-2; H-6'	115,1	6,81 (d; 2,1)
5'	116,25	6,76 (d; 8,1)			116,1	6,75 (d; 8,1)
6'	120,00	6,71 (dd; 8,3; 1,6)		H-2; H-2'	119,8	6,69 (dd; 8,1; 2,1)
CH₂						
4	33,24	2,68 (dd; 15,7; 8,0; Ha) 2,87 (dd; 15,7; 4,9; Hb)		H-2; H-5	33,1	2,67 (dd; 15,9; 7,8; Ha) 2,87 (dd; 15,9; 5,1; Hb);
3-OH	-	-			-	-
7-OH	-	-			-	-
3'-OH	-	-			-	-
4'-OH	-	-			-	-

Fonte: o próprio autor.

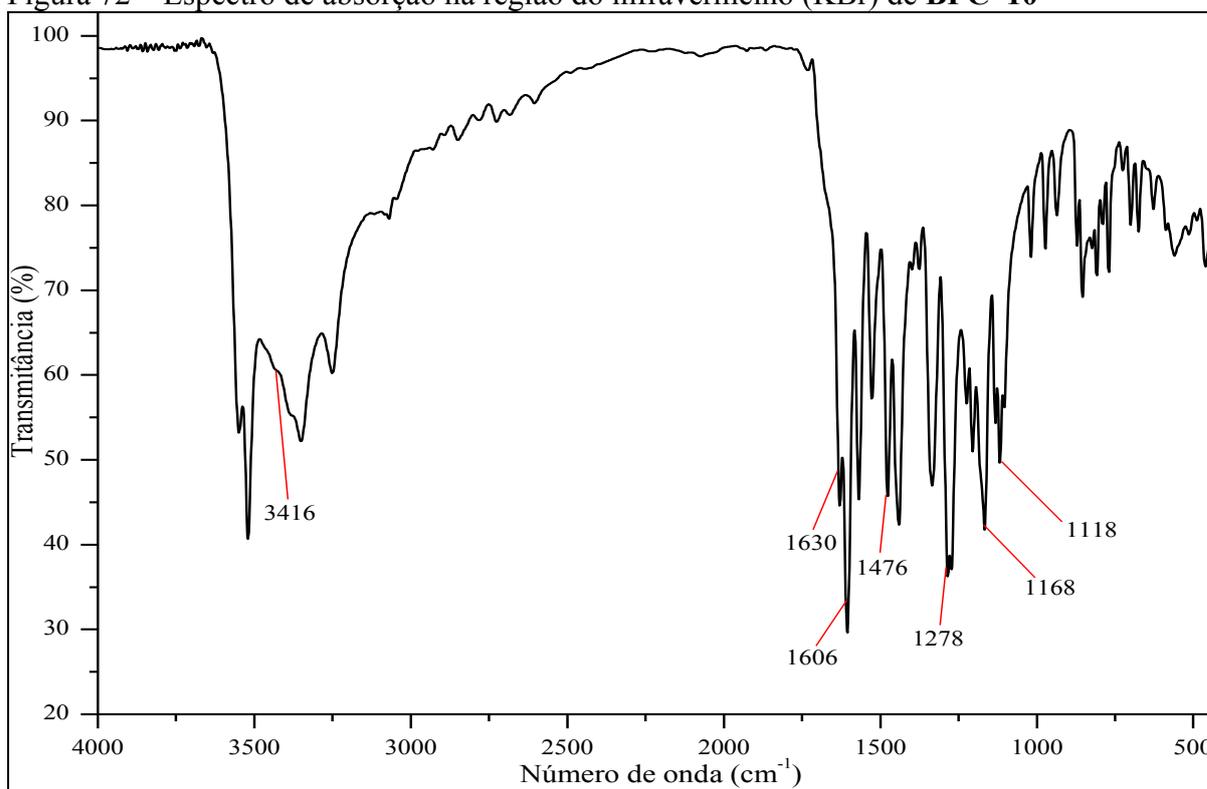
Ha: Hidrogênio na posição *axial*; **Hb:** Hidrogênio na posição *equatorial*

5.1.10 Determinação estrutural de BPC-10

A metodologia descrita no item 6.4.1.19 (pág. 128) resultou no isolamento de um sólido amorfo de coloração amarela (11,0 mg), solúvel em metanol, com ponto de fusão na faixa de 251–252 °C, literatura: p.f. = 299–300 °C (SRINIVASAN *et al.*, 2016), que foi denominado de **BPC-10**.

A análise do espectro na região do infravermelho (IV) de **BPC-10** (Figura 72) permitiu verificar uma banda centrada em 3416 cm^{-1} associada à deformação axial de ligação O–H, além de uma banda em 1630 cm^{-1} referente à deformação axial de ligação C=O. Foram observadas bandas em 1606 e 1476 cm^{-1} relacionadas à deformação axial de ligação C=C de anel aromático. Vale ressaltar que as bandas de absorção em 1278, 1168 e 1118 cm^{-1} são atribuídas à deformação axial de ligação C–O (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA *et al.*, 2015).

Figura 72 – Espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) de **BPC-10**

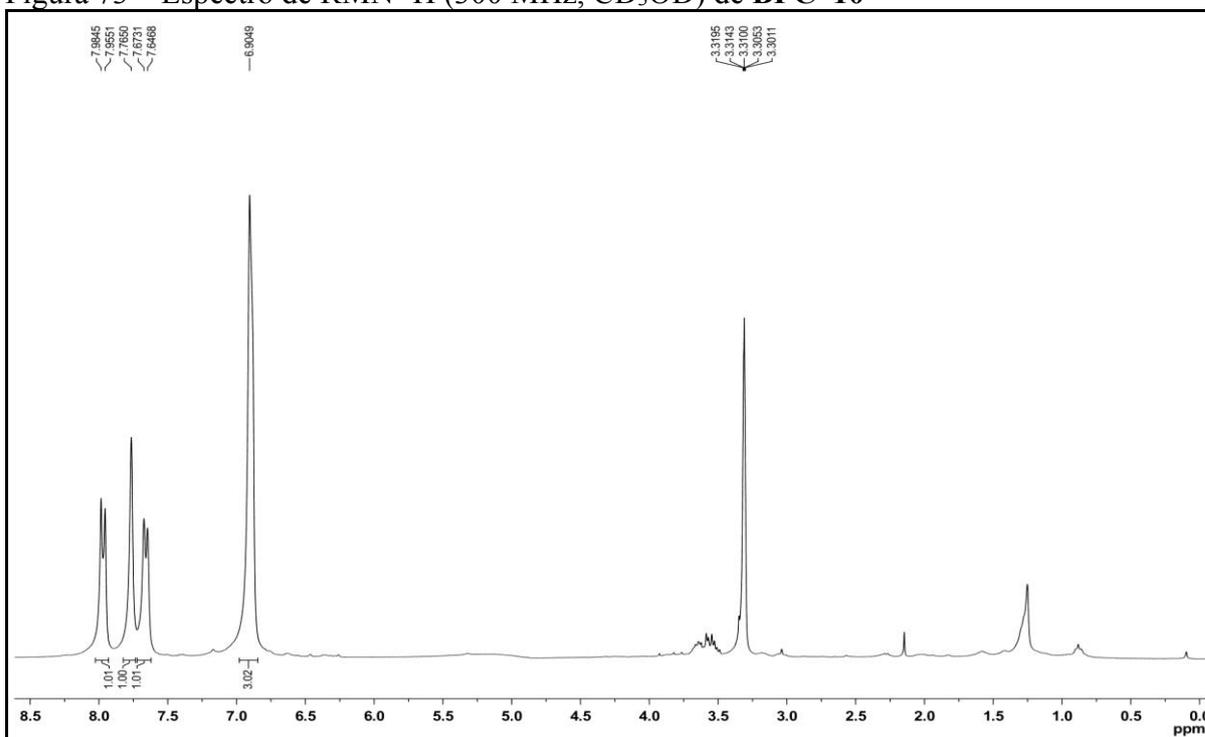


Fonte: o próprio autor.

No espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD , Figura 73, pág. 97) de **BPC-10** foi possível observar sinais na região entre δ_{H} 6,89–7,99, revelando que a estrutura química desse composto contém somente hidrogênios ligados a carbonos de anel aromático. Os sinais em δ_{H}

7,97 (1H; d; $J = 8,8$ Hz) e δ_H 7,66 (1H; d; $J = 7,9$ Hz) revelaram a presença de hidrogênios *orto* posicionados, que foram confirmados através dos valores de deslocamentos químicos e das constantes de acoplamento. Observou-se também o sinal em δ_H 7,76 (1H; s), com integração para um hidrogênio. A análise do espectro de RMN $^1H \times ^{13}C$ -HSQC revelou sinais sobrepostos integrados para três (3H) em δ_H 6,90 que foram associados a hidrogênios ligados a carbonos com deslocamentos químicos diferentes. Vale ressaltar que não foi possível distinguir a multiplicidades desses hidrogênios.

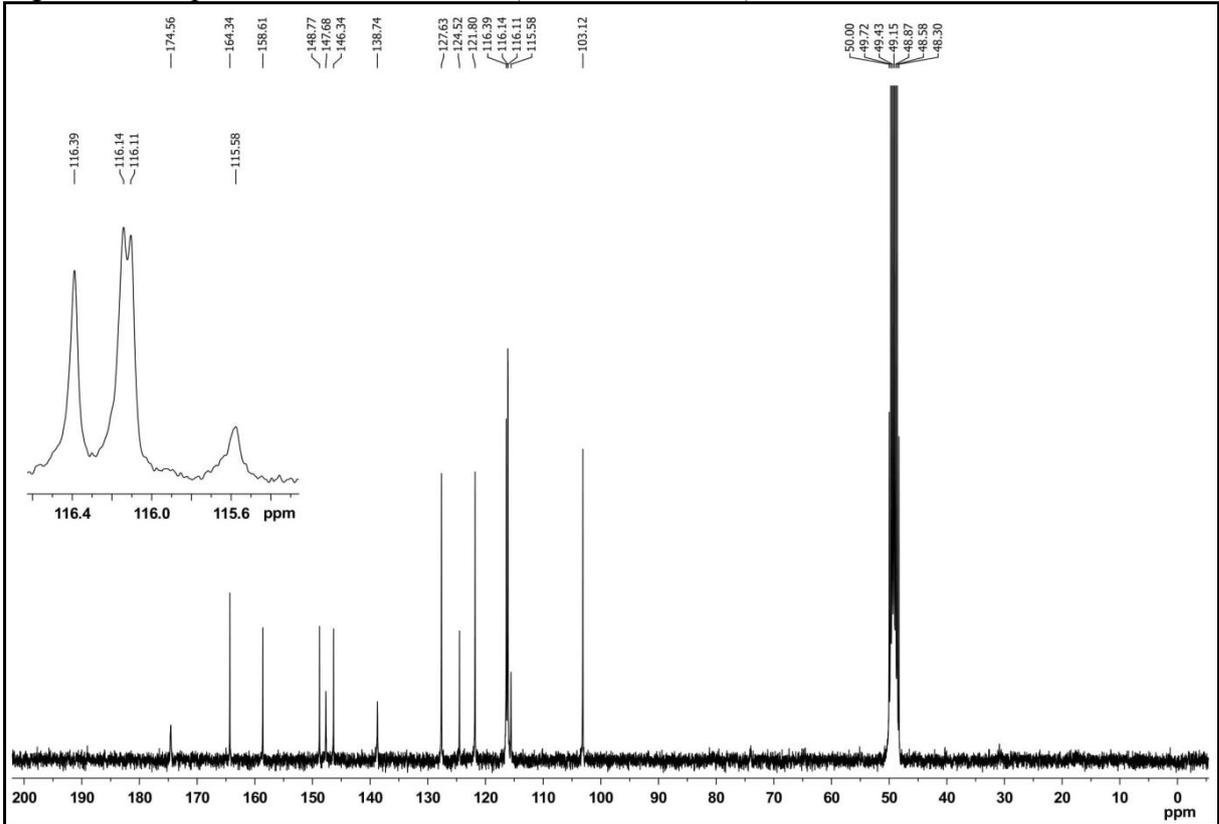
Figura 73 – Espectro de RMN 1H (300 MHz, CD_3OD) de **BPC-10**



Fonte: o próprio autor.

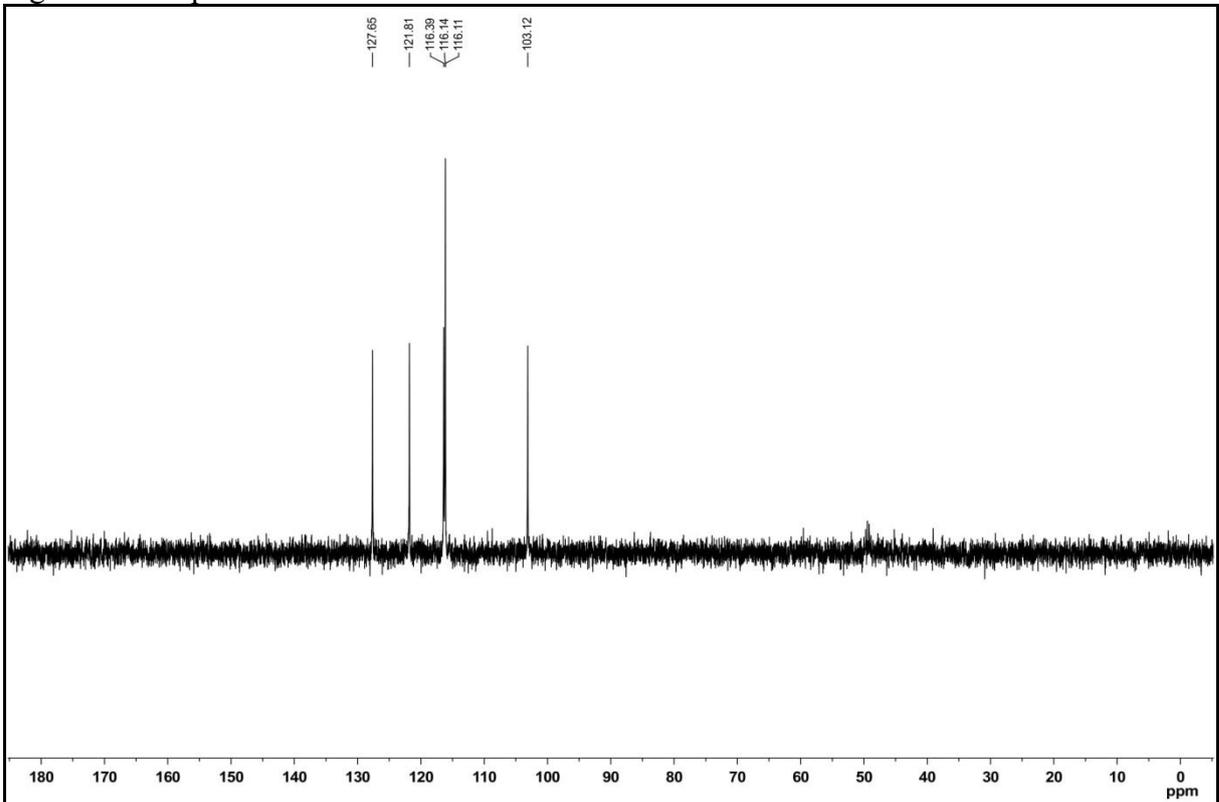
O espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CD_3OD , Figura 74, pág. 98) de **BPC-10** revelou 15 linhas espectrais, sendo todas na região de carbonos com hibridização sp^2 . Vale destacar sete sinais mais desprotegido em δ_C 174,56, δ_C 164,34, δ_C 158,61, δ_C 148,77, δ_C 147,68, δ_C 146,34 e δ_C 138,74 relacionados a carbonos sp^2 oxigenados. Vale salientar a presença de um sinal em δ_C 174,56 que foi associado a carbono carbonílico α,β -insaturado, devido ao valor do deslocamento químico que se encontra menor em relação a carbono de carbonila não conjugada. A análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C -BB e ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CD_3OD , Figura 75, pág. 98) permitiu determinar o padrão de hidrogenação dos átomos de carbono, identificando, desta forma, nove carbonos não hidrogenados (C) e seis carbonos metínicos (CH) (Tabela 11, pág. 102).

Figura 74 – Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CD_3OD) de **BPC-10**



Fonte: o próprio autor.

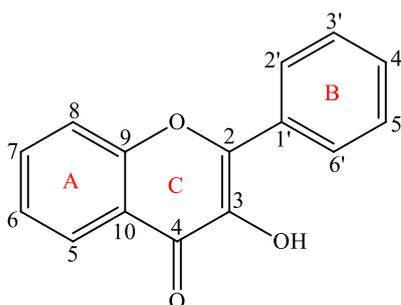
Figura 75 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° de **BPC-10**



Fonte: o próprio autor.

A análise dos dados espectroscópicos de **BPC-10** possibilitou sugerir a fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_6$, cujo índice de deficiência de hidrogênio (IDH) é igual a onze, compatível com o esqueleto básico de um flavonol (Figura 76).

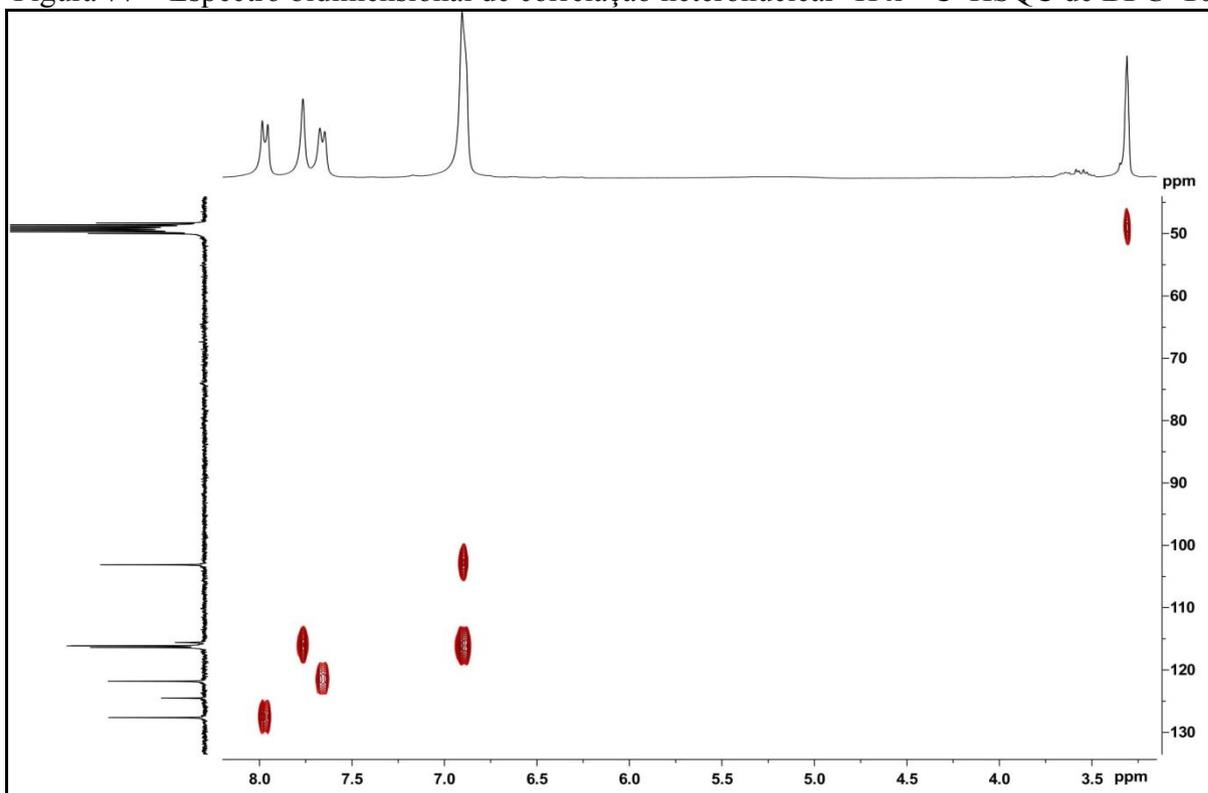
Figura 76 – Esqueleto básico de um flavonol



Fonte: o próprio autor.

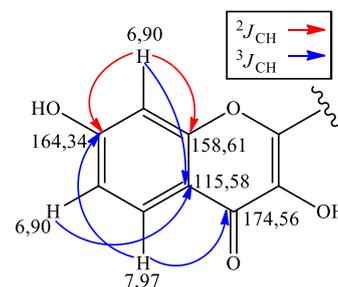
A análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1H \times ^{13}C$ -HSQC (Figura 77) permitiu fazer a associação direta entre todos os sinais de hidrogênios aos seus respectivos átomos de carbonos, conforme mostrado na Tabela 11 (pág. 102).

Figura 77 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1H \times ^{13}C$ -HSQC de **BPC-10**



Fonte: o próprio autor.

O espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$ -HMBC de **BPC-10** (Figura 78), mostrou correlações que possibilitaram definir as posições dos substituintes no esqueleto básico do flavonol. O hidrogênio em δ_{H} 6,90 (H-8) correlacionou a duas ligações ($^2J_{\text{CH}}$) com os carbonos em δ_{C} 164,34 (C-7) e δ_{C} 158,61 (C-9), e a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) com o carbono em δ_{C} 115,58 (C-10). Adicionalmente, o hidrogênio em δ_{H} 6,90 (H-6), correlacionou a $^3J_{\text{CH}}$ com o carbono em δ_{C} 115,58 (C-10). Além disso, o hidrogênio em δ_{H} 7,97 (H-6) correlacionou a $^3J_{\text{CH}}$ com os carbonos em δ_{C} 174,56 (C-4) e δ_{C} 164,34 (C-7).



No anel B presente na estrutura do flavonol (Figura 76, pág. 99), observou-se as correlações a duas e três ligações do hidrogênio em δ_{H} 7,76 (H-2') com os carbonos em δ_{C} 146,34 (C-3') e δ_{C} 148,77 (C-4'), respectivamente. Além disso, o hidrogênio em δ_{H} 7,66 (H-6') correlacionou a duas ligações com o carbono em δ_{C} 116,14 (C-5') e a três ligações com os carbonos em δ_{C} 116,11 (C-2') e δ_{C} 148,77 (C-4'), definindo desta forma a posição das hidroxilas.

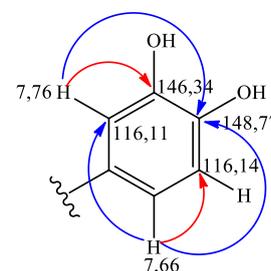
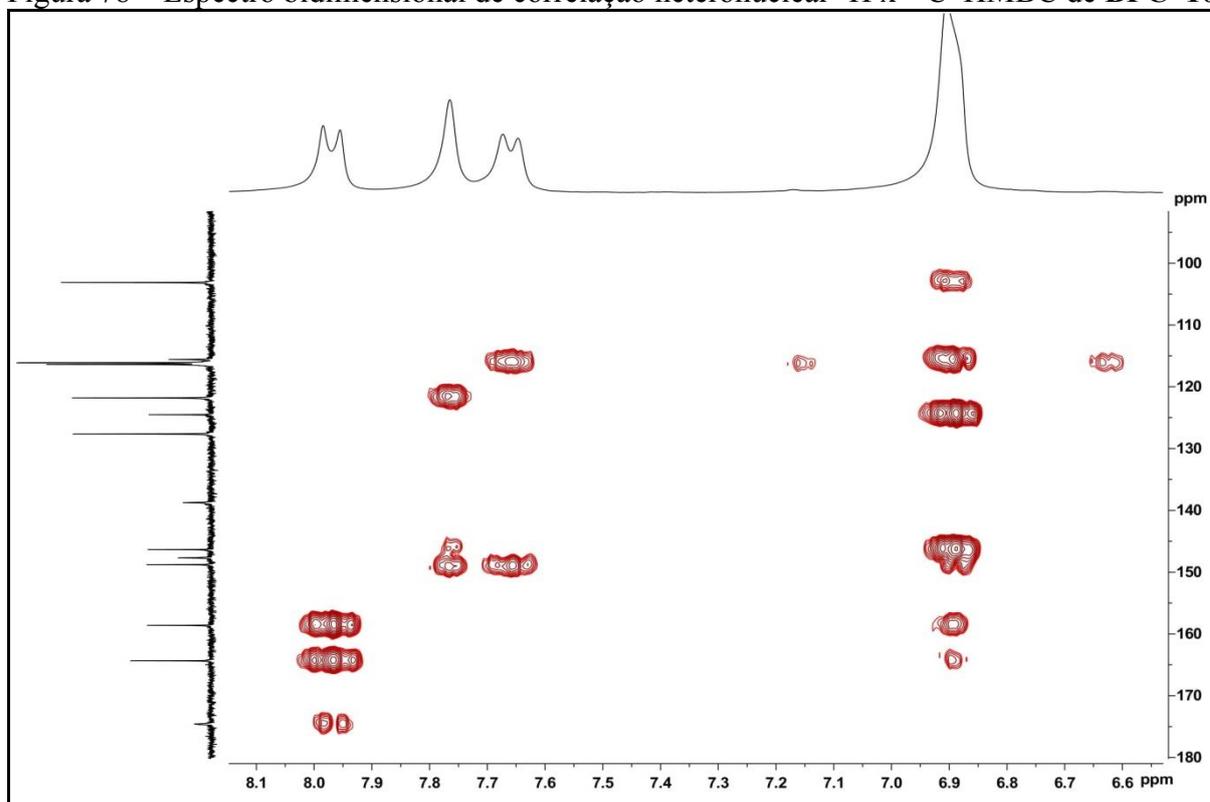


Figura 78 – Espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de **BPC-10**



Fonte: o próprio autor.

O espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (Figura 79) de **BPC-10** exibiu as correlações que confirmaram os sistemas existentes na estrutura proposta. Foram observadas correlações entre os hidrogênios em δ_{H} 7,97 (H-5) e 6,90 (H-6), além de correlações entre os hidrogênios em δ_{H} 6,90 (H-5') e δ_{H} 7,66 (H-6'). Vale ressaltar que essas correlações são relacionadas a hidrogênios em posição *orto* (aneis A e B), confirmando os sistemas existentes na estrutura proposta.

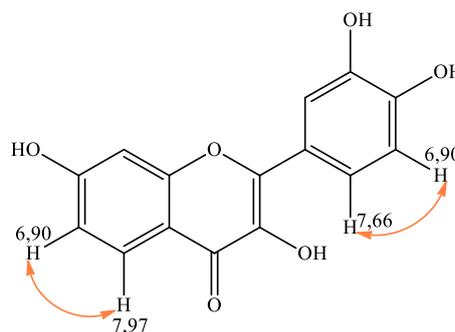
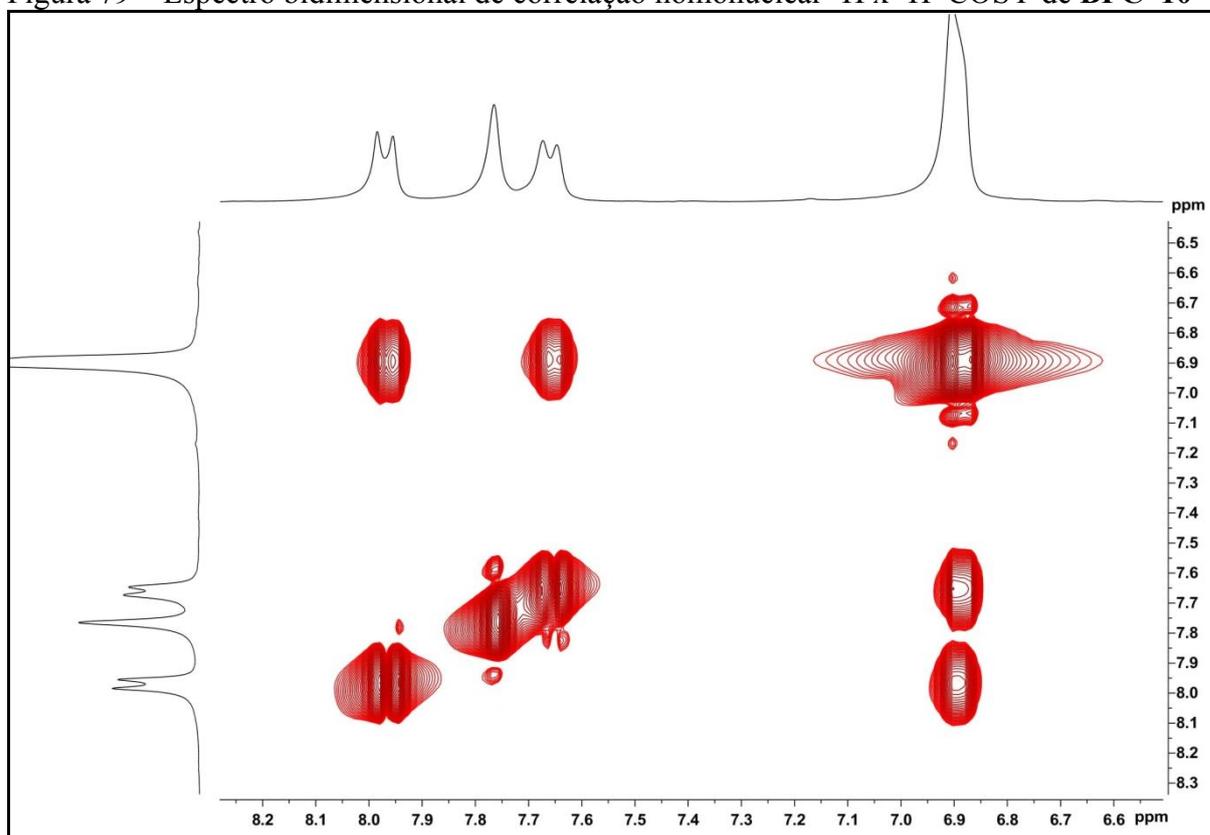


Figura 79 – Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de **BPC-10**

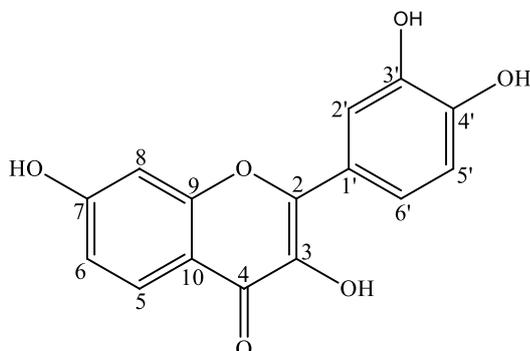


Fonte: o próprio autor.

Através da análise dos dados espectroscópicos obtidos e a posterior comparação com dados descritos na literatura (COSTA *et al.*, 2014; Tabela 11, pág. 102) foi possível identificar **BPC-10** como o flavonoide da classe dos flavonóis (3,7,3',4'-tetraidroxiavona) denominado de fisetina (Figura 80, pág. 102). Esse composto já foi isolado de *B. glauca* (XU *et al.*, 2015) e está sendo relatado pela primeira vez na espécie *B. pentandra*. Vale ressaltar que essa substância apresenta diversas atividades tais como antifúngica (COSTA *et al.*, 2014),

antiproliferativa (KLIMASZEWSKA-WIŚNIEWSKA *et al.*, 2019) e atividade anticâncer (KLIMASZEWSKA-WISNIEWSKA *et al.*, 2016).

Figura 80 – Estrutura da fisetina



Fonte: o próprio autor.

Tabela 11 – Dados espectroscópicos de **BPC-10** comparados com os dados descritos na literatura (COSTA *et al.*, 2014) para a 3,3',4',7-tetraidroxiflavona (fisetina)

	BPC-10 (CD ₃ OD)		HMBC		Literatura (CD ₃ OD)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., <i>J</i> Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C (ppm)	δ_H (ppm, multip., <i>J</i> Hz)
C						
2	147,68	-			147,1	-
3	138,74	-			138,6	-
4	174,56	-		H-5	173,4	-
7	164,34	-	H-8	H-5	164,0	-
9	158,61	-	H-8	H-5	158,5	-
10	115,58	-		H-6	115,4	-
1'	124,52	-		H-5'	124,2	-
3'	146,34	-	H-2'	H-5'	147,1	-
4'	148,77	-	H-5'	H-2'/6'	147,1	-
CH						
5	127,63	7,97 (d; 8,8)			127,6	7,98 (d; 8,7)
6	116,39	6,90*		H-8	116,0	6,92 (dd; 8,7; 2,1)
8	103,12	6,90*		H-6	103,0	6,91 (d; 2,1)
2'	116,11	7,76 (s)		H-6'	115,9	7,76 (d; 2,1)
5'	116,14	6,90*	H-6'		116,0	6,88 (d; 8,1)
6'	121,80	7,66 (d; 7,9)			121,6	7,66 (dd; 8,1; 2,1)
3-OH	-	-			-	-
7-OH	-	-			-	-
3'-OH	-	-			-	-
4'-OH	-	-			-	-

Fonte: o próprio autor.

* Multiplicidade não definida.

5.2 Atividades biológicas

5.2.1 Avaliação da atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase

Compostos fenólicos apresentam atividade inibitória da acetilcolinesterase (XIE *et al.* 2014; CAKMAK; GULCIN, 2019; POSRI *et al.*, 2019), e neste contexto, o extrato etanólico do caule de *Bauhinia pentandra* (**EEBPC**) e os compostos isolados bauhiniastatina 1 (**BPC-2**), bauhiniastatina 4 (**BPC-3**), 7,4'-diidroxiflavona (**BPC-4**), (2*S*)-liquiritigenina (**BPC-5**), (2*S*)-naringenina (**BPC-6**), isoliquiritigenina (**BPC-7**) e fisetina (**BPC-10**) foram avaliadas como potenciais inibidores da acetilcolinesterase pelo método de Ellman modificado (ELLMAN *et al.*, 1961; RHEE *et al.*, 2001) e os resultados são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12 – Resultado referente à inibição da enzima acetilcolinesterase das amostras testadas

Amostras	Resultado	Tamanho do “halo” (cm)
EEBPC*	positivo	0,3
BPC-2**	negativo	-
BPC-3**	positivo	0,7
BPC-4**	positivo	0,9
BPC-5**	positivo	0,7
BPC-6**	positivo	0,7
BPC-7**	positivo	0,6
BPC-10**	positivo	0,7
Padrão eserina (1mg/mL)	positivo	0,9

Fonte: o próprio autor.

*Extrato etanólico dos caules de *Bauhinia pentandra*; **Compostos isolados.

Neste experimento ocorreu a formação de um halo branco em torno das manchas nas placas de cromatografia em camada delgada (CCD), sendo um indicativo para a inibição da acetilcolinesterase e, entre as amostras testadas, a 7,4'-diidroxiflavona (**BPC-4**) foi a mais ativa, com diâmetro de halo de inibição (0,9 cm) igual ao da eserina, um alcaloide utilizado como padrão de referência (Tabela 12). Vale ressaltar que a bauhiniastatina 1 (**BPC-2**) foi a única substância inativa nesse teste. Por outro lado, o extrato etanólico (**EEBPC**) apresentou atividade menor em relação aos compostos isolados (**BPC-3**), (**BPC-5**), (**BPC-6**),

(**BPC-7**) e (**BPC-10**). Destaca-se que esse é um resultado aceitável para um extrato bruto, pois o mesmo é constituído por uma variedade de compostos. Vale salientar que esse é o primeiro relato da atividade inibitória da acetilcolinesterase do derivado oxipínico bauhiniastatina 4 (**BPC-3**).

5.2.2 Avaliação da atividade antibacteriana e modificadora da ação antibiótica do (-)-fisetinidol sobre linhagens de bactérias Gram (+) e Gram (-)

5.2.2.1 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana do (-)-fisetinidol (**BPC-9**) foi avaliada através do método de microdiluição. Nos ensaios foram utilizadas duas linhagens de bactérias Gram (+) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus aureus* (11999-B) e uma Gram (-) *Escherichia coli* (ATCC 25922). Os valores da concentração inibitória mínima (CIM) estão mostrados na Tabela 13.

Tabela 13 – Valores de concentração inibitória mínima (CIM) do (-)-fisetinidol (**BPC-9**)

Linhagens	(µg/mL)		Efeito
	CIM	CBM	
<i>Staphylococcus aureus</i> (SA1199-B)	≥1024	-	Inativo
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	≥1024	-	Inativo
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	≥1024	-	Inativo

Fonte: o próprio autor.

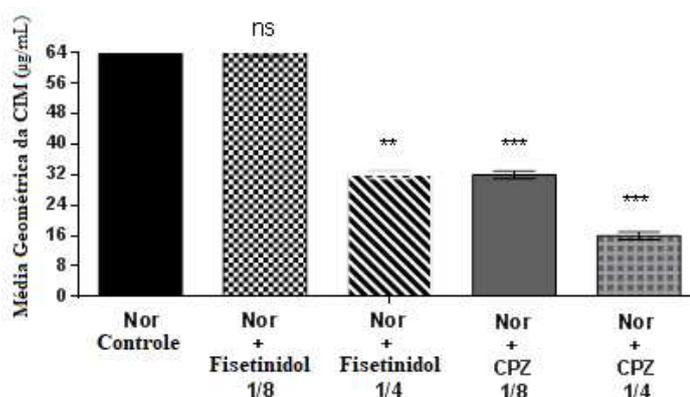
Os resultados revelam que (-)-fisetinidol (**BPC-9**) não apresentou atividade antibacteriana contra cepas testadas em concentrações menores que 1024 µg/mL. De acordo com a literatura compostos isolados são consideradas bons agentes antimicrobianos quando apresentam valores de CIM ≤ 10 µg/mL (RIOS; RECIO, 2005).

5.2.2.2 Avaliação da atividade modificadora da ação antibiótica

A Figura 81 (pág. 105) apresenta os valores de CIM do norfloxacino, fármaco utilizado como controle positivo, e do antibiótico em associação com (-)-fisetinidol (**BPC-9**)

em concentração sub-inibitória, onde não foi possível observar efeito nem sinérgico tão pouco antagônico da associação com (-)-fisetinidol (**BPC-9**) na concentração de CIM 1/8. Porém é possível observar sinergismo da associação Nor + (-)-fisetinidol na concentração de CIM 1/4, caindo em 2 vezes para 32 $\mu\text{g/mL}$. Quando comparado com os dados do Nor + fisetinidol 1/4 com a clorpromazina (CPZ), que é um inibidor clássico, foi possível observar significância, sendo isso um indicativo que está havendo reversão da resistência bacteriana.

Figura 81 – Efeito da atividade modificadora de antibióticos do (-)-fisetinidol (**BPC-9**) contra *S. aureus* (1199-B) utilizando o norfloxacino como controle positivo



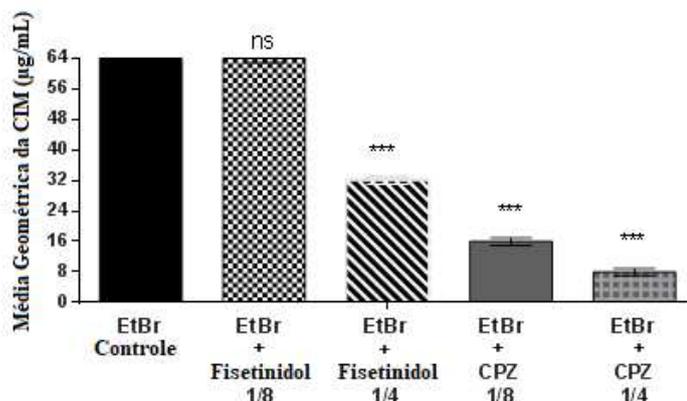
Fonte: o próprio autor.

Os dados foram analisados usando o teste ANOVA a dois fatores, média geométrica de triplicatas com um centro determinado e o desvio padrão. Foi realizado um teste post-hoc de Bonferroni (onde $p < 0,05$; $p < 0,0001$ foram considerados significativos e $p > 0,05$ não significantes) NS. A mesma análise foi realizada para a inibição de efluxo do item 5.2.2.3.

5.2.2.3 Inibição de efluxo pela redução da CIM do brometo de etídeo (EtBr)

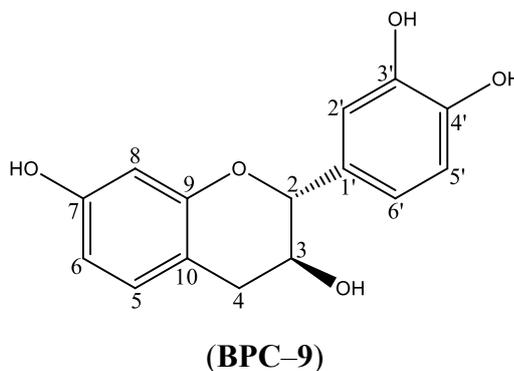
A redução do CIM do EtBr é utilizada como um possível marcador da reversão da resistência bacteriana. Os resultados de inibição do efluxo ativo contra a cepa *S. aureus* (1199-B) demonstraram que houve redução significativa da CIM da associação EtBr + (-)-fisetinidol 1/4 em 2 vezes, quando comparado com o CIM do inibidor CPZ + EtBr (Figura 82, pág. 106).

Figura 82 – Efeito da atividade modificadora de antibióticos do (-)-fisetinidol (**BPC-9**) contra *S. aureus* (1199-B) utilizando brometo de etídio (EtBr) como marcador



Fonte: o próprio autor.

A estrutura da membrana bacteriana apresenta características hidrofóbicas, que possivelmente, impedem a ação do composto sozinho, e observando-se que o (-)-fisetinidol (**BPC-9**), cuja representação estrutural está mostrada abaixo, apresenta quatro hidroxilas em sua estrutura química, o que pode contribuir para dificultar sua interação com a membrana, impossibilitando, dessa forma, sua entrada no interior da bactéria.



A cepa de *S. aureus* (1199-B) confere resistência as fluoroquinolonas hidrofílicas pelo mecanismo de efluxo pela proteína Nor A. O substrato EtBr é um composto que confere mecanismo de resistência bacteriana por extrusão bombeado por efluxo. O efeito reversor da resistência bacteriana pode ser observado quando existe uma inibição desta resistência, isso pode acontecer pela inibição do gene *nor A*, que é o responsável pela expressão da bomba de efluxo pela inibição da fonte de energia (proton motiva), no qual, a bomba Nor A se utiliza

para que venha desempenhar sua atividade ou pela inibição direta entre um composto e a bomba (TINTINO, 2018; COSTA, *et al.*, 2016).

O fármaco antipsicótico clorpromazina (CPZ) destaca-se por possuir uma ampla faixa de atividade antibacteriana, a qual cobre desde patógenos Gram-positivos e Gram-negativos. Esse fármaco atua inibindo proteínas transmembranares ou bomba de efluxo presente em microrganismos resistentes como na cepa *S. aureus* (1199-B) (LIMA; RAMOS-ALVES; SOARES, 2019).

A ação do efeito reversor da resistência bacteriana observada entre associação do composto fisetinidol $\frac{1}{4}$ + Nor ou EtBr se dá levando em consideração as quatro possibilidades citadas anteriormente. Porém uma delas chama atenção devido ao fato da bomba de efluxo Nor A utilizar força proton motiva, e o composto apresentar várias hidroxilas, o que possivelmente facilitaria redução desses prótons disponíveis.

Uma inibição direta com a proteína Nor A não seria uma alternativa mais adequada, visto que a proteína apresenta maiores afinidades por compostos que venham a ter grupos lipofílicos. Estudos comparativos utilizando vários flavonoides com adição de metoxilas, mostrou que o flavonoide com maior quantidade destas em suas ramificações apresentou melhor efeito inibitório reduzindo a concentração inibitória mínima em 16 vezes (SILVA, 2015; MAIA *et al.*, 2011).

6 PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Material vegetal

O caule de *B. pentandra* foi coletado na comunidade dos Tabebas, no município de Caucaia, Ceará. A coleta foi realizada no dia 17 de março de 2016, no período da manhã, sob as coordenadas geográficas 3° 41' 16''S 38° 42' 43'' O, que foram registradas com o Sistema de Processamento Global (GPS) presente no celular modelo Iphone 5S. Uma exsicata de *B. pentandra* encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, sob o número de registro 59159. A identificação botânica foi realizada pelo servidor Luiz Wilson Lima-Verde em 23 de março de 2016.

6.2 Métodos analíticos

6.2.1 Métodos cromatográficos

6.2.1.1 Cromatografia de adsorção em coluna (CC)

Nas cromatografias de adsorção em coluna (CC) utilizou-se gel de sílica 60 (Φ 0,063–0,200 mm) e gel de sílica (Φ 0,035–0,070 mm) para cromatografia do tipo *flash*, ambas das marcas Vetec[®] e Macherey–Nagel[®] e para a cromatografia de exclusão molecular utilizou-se Sephadex LH–20 da marca Pharmacia[®]. Nas cromatografias de adsorção em coluna sob média pressão (*flash*) utilizou-se um sistema adaptado com bomba compressora do fabricante NS Indústria de Aparelhos Médicos Ltda. Os comprimentos e diâmetro das colunas variaram de acordo com as quantidades de amostras a serem cromatografadas e adsorventes utilizados.

Foram utilizados solventes de qualidade PA tais como hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol das marcas Synth[®], Neon[®] e Dinâmica[®]. A remoção dos solventes de extratos e das frações resultantes das cromatografias foi realizada em evaporador rotatório BÜCHI Rotavapor *Waterbath* modelo B-480 e R-114, sob pressão reduzida.

6.2.1.2 Cromatografia de adsorção em camada delgada (CCD)

As análises cromatográficas em camada delgada foram realizadas em gel de sílica G60 da Vetec[®] sobre suporte de vidro e em gel de sílica 60 F₂₅₄ sobre alumínio da Silicycl[®].

As revelações das substâncias nas cromatoplasmas analíticas foram realizadas por exposição das mesmas à irradiação ultravioleta (UV) em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm), emitidos por lâmpada modelo VL-4.LC da Vilber Lourmat, seguida de imersão em solução de vanilina (C₈H₈O₃) (5g de vanilina/100mL de etanol + 4,5mL de ácido perclórico (HClO₄) 0,75M/95,5mL de água destilada) e por fim, aquecimento em chapa aquecedora da Fisatom Modelo 752A por aproximadamente 60 °C durante alguns segundos.

6.2.1.3 Extração em fase sólida (EFS)

A extração em fase sólida (EFS) foi realizada em cartucho de fase reversa (Strata C18-E, 20g/60,0 mL, 55 µm, 70 Å) da Phenomenex[®]. A utilização do cartucho foi precedida por ativação do adsorvente com MeOH grau CLAE da Tedia[®], seguida de H₂O Milli-Q, utilizando alíquotas equivalentes a três vezes o volume do cartucho (CUTIGNANO *et al.*, 2015).

6.2.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises por CLAE foram realizadas em aparelho da marca SHIMADZU, modelo UFLC (*Ultra Fast Liquid Chromatograph*), equipado com detector UV-Vis com arranjo de diodo (SPD-M20A) e um sistema de bomba ternário. Utilizou-se coluna de fase reversa, preenchidas com C-18 da marca Phenomenex[®] com as seguintes especificações: (2,5 x 250 nm, 5 µm) analítica e (4,6 x 250 nm, 5 µm) semi-preparativa, sendo mantidas em forno ternário a 35 °C. As amostras foram eluídas com água levemente acidificada com ácido trifluoracético (TFA) a 0,1%, acetonitrila e metanol.

Os solventes empregados apresentavam grau de pureza CLAE (MeOH, ACN da Tedia[®] e H₂O-Milli-Q, levemente acidificada com TFA), os quais, foram adequadamente filtrados através de membranas de nylon com poros de 0,45 µm (Millipore). As amostras foram dissolvidas nas fases móveis empregadas em cada análise ou em mistura com THF e posteriormente filtradas em membranas de PTFE (politetrafluoretileno) com poros de 0,45 µm (Whatman[®]).

6.2.2 Métodos físicos de análise

6.2.2.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho, com janela espectral de 400 a 4000 cm^{-1} , utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr) na proporção de 1% de amostra, foram obtidos em espectrômetro FTLA 2000-102, ABB-BOMEM do Laboratório de Bioinorgânica da Universidade Federal do Ceará, e o posicionamento das deformações e ajuste do espectro foi feito no programa OriginPro 8.

6.2.2.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono-13 (RMN ^{13}C), uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro da marca Bruker[®], modelo Avance DPX-300 pertencente ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará, operando na frequência de 300 MHz para hidrogênio, e de 75 MHz para carbono-13.

Os solventes utilizados na dissolução das amostras foram clorofórmio (CDCl_3) e metanol (CD_3OD) deuterados. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados nos espectros de RMN ^1H pelos sinais dos hidrogênios das moléculas residuais não deuteradas em δ_H 7,27 e δ_H 3,31, para clorofórmio e metanol, respectivamente. Já nos espectros de carbono-13, os deslocamentos químicos (δ) foram referenciados pelos sinais de carbono-13 em δ_C 77,23 e δ_C 49,15 para os solventes já citados acima, respectivamente.

A multiplicidade das absorções foi indicada como simpleto (s); duplete (d); duplete de duplete (dd), tripleto (t) e multiplete (m). O padrão de hidrogenação dos carbonos foi determinado através da técnica DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) com ângulo de nutação de 135° , gerando sinais para CH e CH_3 em oposição no plano ao CH_2 , onde os carbonos não hidrogenados foram caracterizados pela subtração dos sinais observados no espectro BB (Broad Band) e também por APT (*Attached Proton Test*), gerando sinais para C e CH_2 em oposição no plano ao CH e CH_3 .

6.2.2.3 Ponto de fusão

Os pontos de fusão das substâncias isoladas foram determinados em equipamentos de microdeterminação digital da Metler Toledo® com placa aquecedora FP82HT e uma central de processamento FP90. As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 2 °C/min, não sendo corrigidas.

6.3 Ensaios de atividades biológicas

6.3.1 Ensaio para inibição da enzima acetilcolinesterase

Esse ensaio é baseado no procedimento descrito por Ellman *et al.* (1961), adaptado para CCD por Rhee *et al.* (2001). Os reagentes iodeto de acetilcolina (ATCI), enzima acetilcolinesterase (AChE) e ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). É um método rápido e sensível para a seleção de amostras com ação anticolinesterásica, podendo ser utilizado de forma qualitativa e quantitativa, mas nesse trabalho foi utilizada somente a forma qualitativa. A metodologia consistiu em retirar uma alíquota de 5µl do extrato etanólico do caule de *Bauhinia pentandra* (EEBPC) na concentração de 10 mg/mL e 1mg/mL dos compostos puros (BPC-2 a BPC-7; BPC-10) que foram aplicados em uma cromatoplaça (DC-Alufolien, Silicagel 60 F254, 0,2 mm Merck). Após a completa evaporação do solvente, foi borrifado uma mistura (1:1) de iodeto de acetilcolina (ATCI) 1mmol/L com o reagente de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) DTNB, 1 mmol/L), deixando em repouso por 3 minutos para a secagem da placa. Em seguida foi borrifado a enzima acetilcolinesterase (4,5 U/mL). A atividade anticolinesterásica do extrato e compostos puros foi detectada através do método colorimétrico pela formação de um halo branco em torno dos *spots* onde foram aplicadas as amostras. Como controle positivo, foi utilizada a solução do padrão de sal eserina na concentração de 1mg/mL.

6.3.2 Atividade antibacteriana e o efeito modificador da ação antibiótica sobre linhagens de bactérias Gram (+) e Gram (-)

6.3.2.1 Reagentes

O dimetilsulfóxido (DMSO) foi o solvente usado para diluir o (-)-fisetinidol (**BPC-9**), o antibiótico utilizado foi Norfloxacin e o substrato utilizado como marcador da inibição do efluxo foi o brometo de etídio (EtBr) todos na concentração inicial de 256 µg/mL.

6.3.2.2 Cepas microbianas

Os microrganismos utilizados nos testes foram obtidos através do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LPM) da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Foram utilizadas linhagens de bactérias Gram (+) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus aureus* (11999-B) resistente as fluoroquinolonas hidrofílicas e Gram (-) *Escherichia coli* (ATCC 25922).

6.3.2.3 Preparo dos inóculos

As culturas bacterianas foram reativadas em BHI-3% após o período de 24 h a 37 °C para crescimento. Posteriormente, foi realizado um arrasto de cada cultura microbiana e diluído em tubos de ensaio contendo 3 mL de solução salina 0,9% levados à turbidez da solução até se igualar ao controle de McFarland 0,5%.

6.3.2.4 Substâncias testes

Após ter sido diluído 10 mg (10.000 µg) de (-)-fisetinidol (**BPC-9**) em 1 mL de dimetilsulfoxido (DMSO) foi reduzido a uma concentração teste de 1024 µg/mL diluído em água destilada estéril (LEAL *et al.*, 2019a).

6.3.2.5 Concentração inibitória mínima (CIM)

Foram preparadas triplicatas para cada bactéria contendo 900 μL de BHI a 10% + 100 μL do inóculo (correspondente a 10% da solução total) para o CIM. Em seguida foram adicionados 100 μL contendo meio e inóculo em cada poço da placa, para posterior microdiluição com 100 μL da substância teste, variando nas concentrações de 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no primeiro poço até 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no penúltimo poço, onde o último poço é dado como controle de crescimento. As placas foram levadas à incubadora por 24 h a 37 °C. A confirmação da CIM bacteriana foi feita utilizando-se a adição de 20 μL de resazurina em cada poço e observação ocular após 1 h (LEAL *et al.*, 2019b).

6.3.2.6 Efeito modificador da ação antibiótica

Para verificar o efeito modificador dos antibióticos frente às cepas testadas, foi utilizado a metodologia descrita em Salazar *et al.*, (2018), sendo preparados *ependorf* contendo substância teste em volume correspondente a concentração sub-inibitória (1/4; 1/8), quantidade de BHI 10 % variável de acordo com o volume da concentração sub-inibitória e 150 μL da suspensão bacteriana (correspondente a 10% da solução). Os controles foram preparados em tubos *ependorf* com 1,5 mL de solução contendo 1350 μL de BHI (10 %) e 150 μL de suspensão de microrganismos. Volumes de 100 μL desta solução em ordem alfabética foram adicionados nos poços de uma placa de microdiluição. Em seguida, foi feita a microdiluição seriada com 100 μL de norfloxacino descartando no penúltimo poço. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, depois adicionado 20 μL de resazurina para determinação de células viáveis por coloração.

6.3.2.7 Inibição de bomba de efluxo por redução da CIM do brometo de etídio

Para esse teste foi realizado um ensaio no qual a norfloxacina foi substituída pelo brometo de etídio (EtBr). Uma vez que o único mecanismo conhecido de resistência ao brometo de etídio contra bactérias se dá por expressão de bombas de efluxo, a ocorrência de acúmulo desse substrato no interior da bactéria se dá pelo efeito inibidor da resistência. Para verificar o efeito de redução da CIM do brometo de etídio, foi utilizada a mesma metodologia citada no item anterior. Como etapa inicial, foi preparado em *ependorfs* o meio de distribuição do teste e do controle. No teste foram colocados 150 μL do inóculo, mais uma

alíquota do (-)-fisetinidol (**BPC-9**) em concentração sub-inibitória (1/4; 1/8) completado o volume do *eppendorf* até o volume de 1,5 mL com BHI. Para o controle foi colocado o mesmo volume de inóculo do teste e completado o volume do *eppendorf* até 1,5 mL.

Em seguida foram transferidos para placas de microdiluição de 96 poços, com distribuição vertical, caracterizada pela adição de 100 μ L do conteúdo do *eppendorf* em cada poço. Após essa etapa foi realizada a microdiluição do brometo de etídio, sendo 100 μ L nesse meio até a penúltima cavidade (1:1). A solução de brometo de etídio utilizada nesse ensaio foi a citada anteriormente. Na última cavidade não foi adicionada por ser o controle de crescimento. Após 24 h foi realizada a leitura das placas por visualização pela adição de 20 μ L resazurina.

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. A redução do CIM do brometo de etídeo ou de antibiótico específico em cepas portadoras de bomba de efluxo é um indicativo de inibição de bomba de efluxo (TINTINO *et al.*, 2016).

6.3.2.8 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o *software* Graphpad Prism, versão 5.0. Os dados obtidos foram verificados quanto à distribuição normal e analisados por ANOVA a dois fatores ($P < 0,05$; * $P < 0,1$; **** $P < 0,0001$), comparando os valores para cada concentração do (-)-fisetinidol (**BPC-9**), ponto a ponto, usando o teste *post-hoc* de Bonferroni. Os resultados dos ensaios antibacterianos foram realizados em triplicata e expressos como média geométrica. A análise estatística foi aplicada usando uma ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

6.4 Estudo dos constituintes fixos de *Bauhinia pentandra*

6.4.1 Obtenção do extrato etanólico do caule de *B. pentandra* (EEBPC)

Os caules de *B. pentandra* secos à temperatura ambiente e triturados (5,45 Kg) foram submetidos à extração a frio com etanol (3 x 10 L). Após filtração e evaporação do solvente sob pressão reduzida, obteve-se 145,0 g (2,7%) de extrato etanólico do caule de *B. pentandra* (EEBPC).

6.4.1.1 Fracionamento cromatográfico do EEBPC

Uma porção do EEBPC (115,0 g) foi submetida a uma coluna filtrante (L = 17,5 cm e ϕ = 10,0 cm), utilizando 350 g de gel de sílica. No fracionamento cromatográfico foram utilizados hexano, diclorometano, acetato de etila, mistura de acetato de etila/metanol e metanol. As frações obtidas tiveram seus solventes evaporados sob pressão reduzida em evaporador rotatório, conforme mostrado na Tabela 14.

Tabela 14 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico do EEBPC

FRAÇÕES	VOLUME (L)	CÓDICO	MASSA (g)
Hexano	1,0	FHBPC	0,01383
Diclorometano	1,6	FDBPC	0,4106
Acetato de Etila	8,0	FABPC	29,4
Acetato de Etila/Metanol	2,1	FAMBPC	63,6
Metanol	2,5	FMBPC	5,31
Total: massa (g) / rendimento (%)			98,73 / 68,1

Fonte: o próprio autor.

6.4.1.2 Tratamento cromatográfico da fração acetato de etila (FABPC)

Uma parte da fração acetato de etila (FABPC; 28,25 g) foi submetida a uma coluna cromatográfica (L = 8,5 cm e ϕ = 6,0 cm), utilizando 102,24 g de gel de sílica como fase estacionária e hexano, acetato de etila e metanol em ordem crescente de polaridade como fase móvel (Tabela 15, pág. 116).

Tabela 15 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da FABPC

FRAÇÕES	ELUENTE	VOLUME (mL)
1 – 12	Hexano/Acetato de etila (90:10)	900
13 – 18	Hexano/Acetato de etila (70:30)	800
19 – 22	Hexano/Acetato de etila (50:50)	700
23 – 25	Acetato de etila	300
26 – 27	Acetato de etila/Metanol (90:10)	600
28	Acetato de etila/Metanol (80:20)	200
29	Acetato de etila/Metanol (50:50)	200
30	Metanol	200

Fonte: o próprio autor.

Após a análise das frações por cromatografia em camada delgada (CCD) foi possível reunir aquelas que apresentaram o mesmo perfil cromatográfico (Tabela 16). Na fração 6, observou-se a formação de um precipitado cristalino, que após separação forneceu a fração **6'** (21,8 mg).

Tabela 16 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico da FABPC

FRAÇÕES REUNIDAS	MASSA (g)
1 – 3	0,581
4 – 5	1.029,0
6	0,783
6'	0,0218
7 – 8	0,469
9 – 12	0,525
13 – 14	0,451
15 – 16	0,363
17 – 18	0,200
19	0,287
20	0,537
21	0,627
22 – 23	1.386,0
24 – 25	19,18
26 – 27	1.253,0
28 – 30	0,416
Total: massa (g) / rendimento (%)	28,08 / 99,4

Fonte: o próprio autor.

6.4.1.3 Tratamento cromatográfico da fração 6' de FABPC e isolamento de BPC-1

A fração 6' (21,8 mg) obtida do fracionamento de FABPC foi submetida a um tratamento cromatográfico em coluna sob média pressão ($\phi = 1,5$ cm e $L = 26,0$ cm), utilizando 13,1 g de gel sílica. O fracionamento foi realizado com eluição isocrática, utilizando como eluente hexano/acetato de etila 15%, obtendo-se 49 frações. Após análise por cromatografia em camada delgada (CCD), as frações que apresentaram perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas, conforme mostrado na Tabela 17.

Tabela 17 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de FABPC (6')

FRAÇÕES REUNIDAS	MASSA (mg)
1 – 13	1,0
14 – 28	17,9
29 – 49	1,6
Total: massa (mg) / rendimento (%)	20,5 / 94,0

Fonte: o próprio autor.

Na fração 14 – 28 (17,9 mg) precipitou um sólido branco cristalino, solúvel em diclorometano, exibindo uma única mancha de coloração azul escura após ser revelada em CCD utilizando solução de vanilina. Essa substância foi denominada BPC-1.

6.4.1.4 Tratamento cromatográfico da fração 15 – 16 de FABPC

A fração 15 – 16 (363,0 mg) obtida do tratamento de FABPC foi submetida a um fracionamento cromatográfico em coluna sob média pressão ($\phi = 2,0$ cm e $L = 22,0$ cm), utilizando 24,0 g de gel sílica como fase estacionária e hexano, acetato de etila e metanol como eluentes, conforme mostrado na Tabela 18.

Tabela 18 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de FABPC (15 – 16)

FRAÇÕES	ELUENTE	VOLUME (mL)
1 – 110	Hexano/Acetato de etila (75:25)	400
111 – 120	Hexano/Acetato de etila (50:50)	100
121 – 225	Acetato de etila	100
126 – 132	Metanol	100

Fonte: o próprio autor.

Através da análise por cromatografia em camada delgada (CCD) foi possível verificar o perfil das frações e posteriormente reuni-las, obtendo 9 frações, conforme informações descritas na Tabela 19.

Tabela 19 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de **FABPC (15 – 16)**

FRAÇÕES REUNIDAS	MASSA (mg)
1 – 29	13,7
30 – 49	11,9
50 – 62	13,4
63 – 84	110,0
85 – 104	66,7
105 – 113	23,7
114 – 117	38,0
118 – 125	12,5
126 – 132	30,6
Total: massa (mg) / rendimento (%)	320,5 / 88,1

Fonte: o próprio autor.

6.4.1.5 Tratamento cromatográfico da fração **30 – 49** de **FABPC (15 – 16)** e isolamento de **BPC-2**

A fração **30 – 49** (11,9 mg) obtida do fracionamento de **FABPC (15 – 16)** foi submetida a um tratamento cromatográfico em coluna ($\phi = 1,5$ cm e $L = 20,0$ cm), empregando como fase estacionária gel sílica (11,0 g) e como fase móvel e de modo isocrático foi utilizado diclorometano/metanol 2% (100 mL), obtendo-se 44 frações. Após análise das frações coletadas, foram reunidas aquelas que apresentaram o mesmo perfil cromatográfico, resultando em cinco frações, de acordo com a Tabela 20.

Tabela 20 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de **FABPC (30 – 49)**

FRAÇÕES REUNIDAS	MASSA (mg)
1 – 2	1,4
13 – 26	5,0
27 – 31	1,2
32 – 35	2,5
36 – 44	1,1
Total: massa (mg) / rendimento (%)	11,2 / 94,1

Fonte: o próprio autor.

Em seguida, a fração **13 – 26** (5,0 mg) foi submetida a um tratamento cromatográfico em coluna ($L = 11,5$ cm e $\phi = 0,8$ cm), utilizando 2,0 g de gel de sílica e empregando eluição isocrática com diclorometano (70 mL), resultando em 33 frações, que posteriormente, foram analisadas por CCD e reunidas, obtendo 3 frações (Tabela 21).

Tabela 21 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de **FABPC (13 – 26)**

FRAÇÕES REUNIDAS	MASSA (mg)
1 – 14	0,6
15 – 27	3,7
28 – 33	0,4
Total: massa (mg) / rendimento (%)	4,7 / 94,0

Fonte: o próprio autor.

A fração **15 – 27** (3,7 mg) precipitou como sólido amorfo de cor preta e quando solubilizada em metanol, apresentava uma coloração vermelha. Após ser revelada em CCD, utilizando solução de vanilina, exibiu uma mancha de cor vermelha clara e foi denominada **BPC-2**.

6.4.1.6 Tratamento cromatográfico da fração **63 – 84** de **FABPC (15 – 16)**

A fração **63 – 84** (110,0 mg) obtida de **FABPC (15 – 16)** foi submetida a tratamento cromatográfico em coluna ($\phi = 1,5$ cm e $L = 27,0$ cm), empregando como fase fixa 14,0 g de gel sílica e utilizando eluição isocrática com diclorometano/metanol 4% (100 mL), obtendo 23 frações. Foi possível a reunião destas frações após análise em CCD, resultando em 4 frações como mostrado na Tabela 22.

Tabela 22 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de **FABPC (63 – 84)**

FRAÇÕES REUNIDAS	MASSA (mg)
1 – 14	6,7
15 – 16	6,9
17 – 18	41,3
19 – 23	51,0
Total: massa (mg) / rendimento (%)	105,9 / 96,3

Fonte: o próprio autor.

6.4.1.7 Tratamento cromatográfico da fração 19 – 23 de FABPC (63 – 84)

A fração 19 – 23 (51,0 mg) obtida de FABPC (63 – 84) foi submetida ao mesmo sistema de eluição usado no procedimento anterior. Foi utilizado como adsorvente 15,0 g de sílica gel em uma coluna (ϕ = 1,5 cm e L = 28,5 cm) e eluente isocrático, empregando de diclorometano/metanol 4% (100 mL), resultando em 29 frações. Após análise em CCD, as frações foram reunidas, obtendo-se 4 frações (Tabela 23).

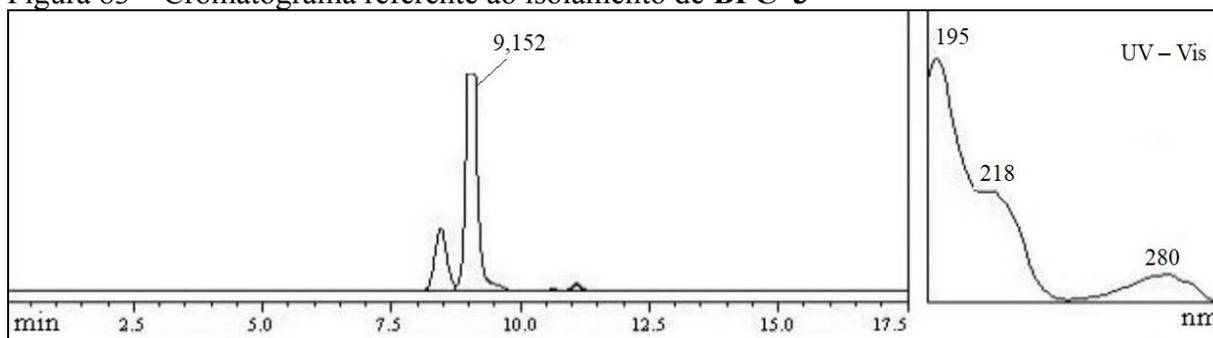
Tabela 23 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de FABPC (19 – 23)

FRAÇÕES REUNIDAS	MASSA (mg)
1 – 15	0,3
16 – 18	8,2
19 – 21	12,0
22 – 29	21,0
Total: massa (mg) / rendimento (%)	41,5 / 81,4

Fonte: o próprio autor.

6.4.1.8 Tratamento cromatográfico da fração 22 – 29 de FABPC (19 – 23) e isolamento de BPC-3

A fração 22 – 29 (21,0 mg) obtida de FABPC (19 – 23) foi solubilizada em H₂O/ACN (60:40) e filtrada e, quando analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um sistema isocrático H₂O/ACN (60:40), com fluxo de 1,00 mL/min e com tempo de eluição de 20 minutos forneceu o cromatograma mostrado na Figura 83 (pág. 121). Posteriormente, foram coletados dois picos com tempo de retenção entre 8,0 e 9,5 minutos, utilizando uma coluna semipreparativa com fluxo de 4,00 mL/min. O composto referente ao pico com tempo de retenção (t_R) 9,152 minutos precipitou na forma de um sólido amorfo branco, exibindo uma mancha de cor vermelha após ser revelada em CCD utilizando solução de vanilina. O espectro na região do UV-Vis desta substância também é mostrado na Figura 83 (pág. 121), e a mesma foi denominada BPC-3 (11,5 mg).

Figura 83 – Cromatograma referente ao isolamento de **BPC-3**

Fonte: o próprio autor.

UV- Vis: Ultravioleta Visível (190 – 400 nm)

6.4.1.9 Tratamento cromatográfico da fração **85 – 104** de **FABPC (15 – 16)**

A fração **85 – 104** (66,7 mg) obtida a partir de **FABPC (15 – 16)** foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna ($\phi = 1,5$ cm e $L = 26,5$ cm), utilizando 14,0 g de gel sílica como adsorvente e eluição isocrática com diclorometano/metanol 4% (100 mL), resultando em 41 frações. Através da análise destas em CCD, aquelas que apresentaram perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas, obtendo-se 6 frações como descrito na Tabela 24.

Tabela 24 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de **FABPC (85 – 104)**

FRAÇÕES REUNIDAS	MASSA (mg)
1 – 18	21,9
19 – 22	14,3
23	6,0
24 – 30	20,0
31 – 40	2,2
41	0,9
Total: massa (mg) / rendimento (%)	65,3 / 97,9

Fonte: o próprio autor.

6.4.1.10 Tratamento cromatográfico da fração (**24 – 30**) de **FABPC (85 – 104)**

A fração **24 – 30** (20,0 mg) resultante do fracionamento de **FABPC (85 – 104)** foi submetida a um tratamento cromatográfico em coluna ($\phi = 1,2$ cm e $L = 20,0$ cm), utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionária e metanol como fase móvel, obtendo 22 frações. Estas foram analisadas por CCD e reunidas em 4 frações (Tabela 25, pág. 122).

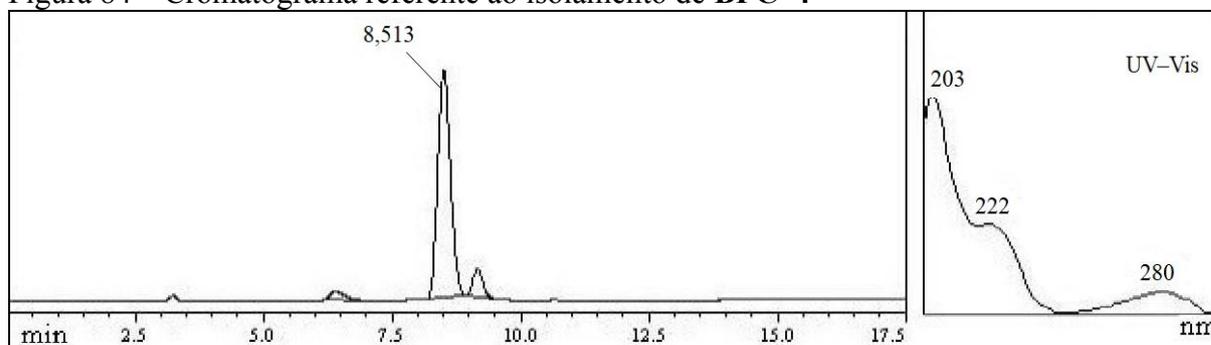
Tabela 25 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de **FABPC (24 – 30)**

FRAÇÕES REUNIDAS	MASSA (mg)
1 – 11	1,4
12 – 14	2,9
15 – 18	12,0
19 – 22	3,5
Total: massa (mg) / rendimento (%)	19,8 / 99,0

Fonte: o próprio autor.

6.4.1.11 Tratamento cromatográfico da fração **15 – 18** de **FABPC (24 – 30)** e isolamento de **BPC-4**

A fração **15 – 18** (12,0 mg) obtida de **FABPC (24 – 30)** foi submetida à mesma metodologia do isolamento de **BPC-2** por CLAE. Inicialmente, a mesma foi solubilizada em H₂O/ACN (60:40) e após filtração foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um sistema isocrático H₂O/ACN (60:40), com fluxo de 1,00 mL/min e com tempo de eluição de 20 minutos fornecendo o cromatograma mostrado na Figura 84. Posteriormente, os dois picos do cromatograma foram coletados utilizando coluna semipreparativa com fluxo de 4,00 mL/min. O composto correspondente ao pico com tempo de retenção (t_R) de 8,513 minutos precipitou como um sólido amorfo branco, exibindo uma mancha de coloração vermelha após ser revelada em CCD utilizando solução de vanilina. O espectro de UV-Vis desta substância é mostrado na Figura 84 e a mesma foi denominada **BPC-4** (6,3 mg).

Figura 84 – Cromatograma referente ao isolamento de **BPC-4**

Fonte: o próprio autor.

UV – Vis: Ultravioleta Visível (200 – 400 nm)

6.4.1.12 Tratamento cromatográfico da fração 114 – 117 de FABPC (15 – 16)

A fração 114 – 117 (38,0 mg) obtida do fracionamento de FABPC (15 – 16) foi submetida a tratamento cromatográfico em coluna (Φ = 1,2 cm e L = 21,5 cm), utilizando Sephadex LH-20 como adsorvente e metanol como fase móvel, resultando em 48 frações. Após análise por CCD foi possível reuni-las, obtendo 2 frações (Tabela 26).

Tabela 26 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de FABPC (114 – 117)

FRAÇÕES REUNIDAS	MASSA (mg)
1 – 19	22,4
20 – 48	14,8
Total: massa (mg) / rendimento (%)	37,2 / 98,0

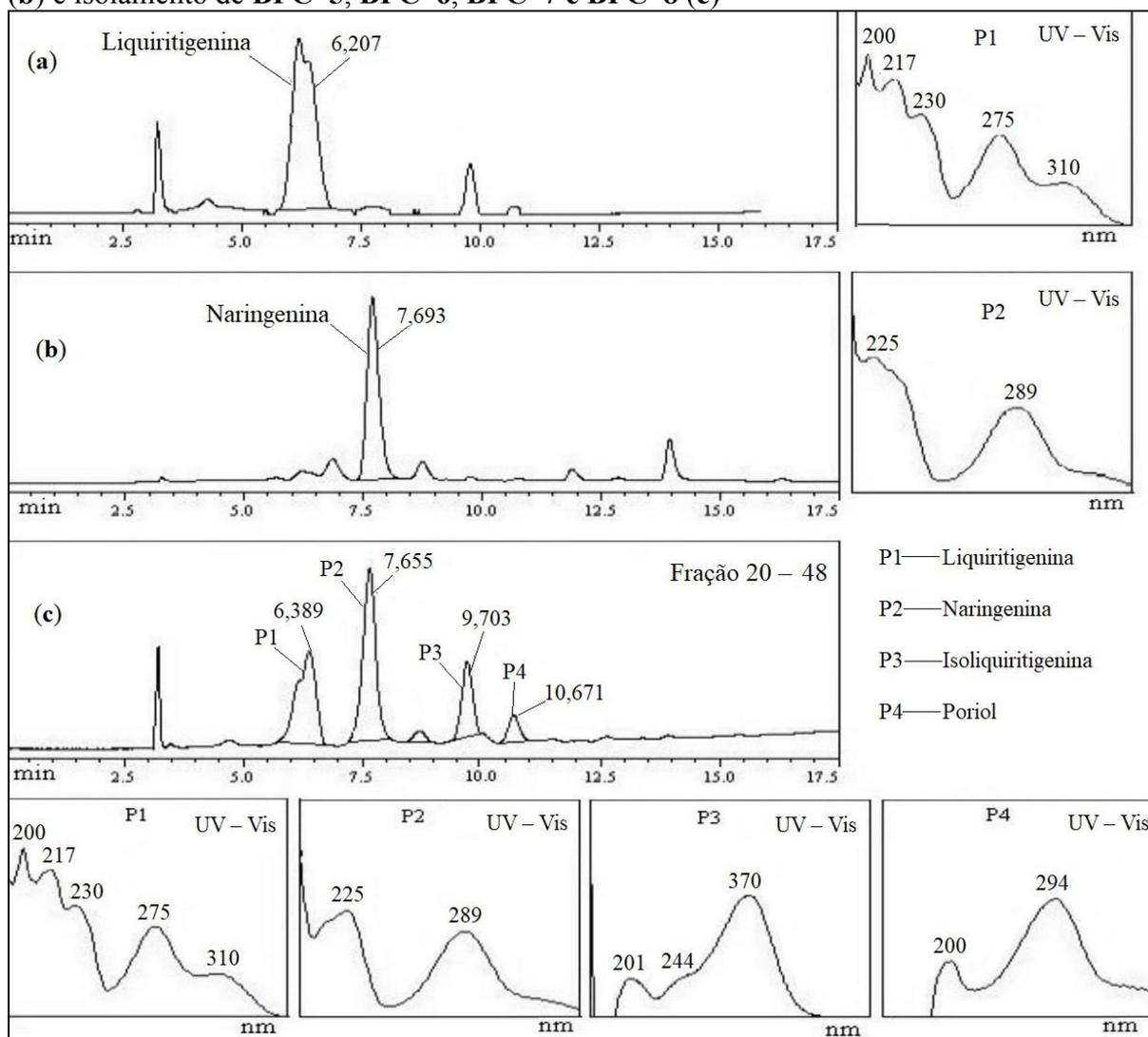
Fonte: o próprio autor.

6.4.1.13 Tratamento cromatográfico das frações 20 – 48 de FABPC (114 – 117); 17–18 de FABPC e isolamento de BPC-5, BPC-6, BPC-7 e BPC-8.

A fração 20 – 48 (14,8 mg) obtida de FABPC (114 – 117) foi solubilizada em MeOH/H₂O (70:30), filtrada e em seguida analisada por CLAE em um sistema com gradiente, iniciando com MeOH/H₂O (70:30), seguindo a MeOH 100% em 10 minutos e mais 5 minutos de MeOH 100% utilizando fluxo de 1,00 mL/min. Paralelamente foram injetados compostos padrões já caracterizados e identificados, tais como, liquiritigenina e naringenina para efeito de comparação e identificação através dos tempos de retenção (t_R) dos picos. A Figura 85 (pág. 124) mostra os cromatogramas da liquiritigenina (a), naringenina (b) e da fração 20 – 48 (c) com seus respectivos espectros de UV-Vis. As coletas foram realizadas em coluna semipreparativa com fluxo de 4,00 mL/min, sendo coletados 4 picos (P1 – P4). Adicionalmente, a fração 17 – 18 (200 mg) de FABPC foi submetida ao mesmo procedimento para obtenção de uma quantidade maior de massa, afim de possibilitar a obtenção dos espectros e identificação de todas as substâncias de interesse. Os compostos correspondentes aos picos P1 e P2 (Fig. 47c) foram identificados através dos tempos de retenção (t_R) em comparação com as substâncias padrões. As amostras BPC-5 (P1; 11,1 mg) e BPC-6 (P2; 25,0 mg) foram identificadas como sendo a liquiritigenina e naringenina, respectivamente. O pico P3 com tempo de retenção (t_R) de 9,703 minutos, precipitou como um sólido amorfo amarelo, sendo denominado como BPC-7 (24,7 mg). Já o pico P4, com

tempo de retenção (t_R) de 10,671 minutos precipitou como um sólido amorfo amarelo, sendo designado como **BPC-8** (14,5 mg). Vale ressaltar que os compostos ao serem revelados em cromatografia em camada delgada (CCD) com solução de vanilina, apresentaram manchas de coloração amarela (**BPC-5** e **BPC-7**) e vermelha (**BPC-6** e **BPC-8**).

Figura 85 – Cromatogramas referentes aos compostos padrões, liquiritigenina (a), naringenina (b) e isolamento de **BPC-5**, **BPC-6**, **BPC-7** e **BPC-8** (c)



Fonte: o próprio autor.

UV-Vis: Ultravioleta Visível (190 – 400 nm)

6.4.1.14 Tratamento cromatográfico da fração 24 – 25 de FABPC

Uma porção da fração 24 – 25 (17,86 g) oriunda do tratamento de FABPC foi fracionada em coluna cromatográfica ($\phi = 5,0$ cm e $L = 25,0$ cm), com 170,0 g de gel sílica (fase estacionária). Os eluentes diclorometano/metanol foram utilizados em ordem crescente de polaridade, de acordo com a Tabela 27.

Tabela 27 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de FABPC (24 – 25)

FRAÇÕES	ELUENTE	VOLUME (mL)
1 – 73	Diclorometano/Metanol (95:5)	1000
74 – 109	Diclorometano/Metanol (90:10)	300
110 – 200	Diclorometano/Metanol (80:20)	800
201	Metanol	200

Fonte: o próprio autor.

O perfil das frações foi verificado por meio da análise de cromatografia em camada delgada (CCD), e, posteriormente elas foram reunidas, resultando em 12 frações, cujas informações estão apresentadas na Tabela 28.

Tabela 28 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de FABPC (24 – 25)

FRAÇÕES REUNIDAS	MASSA (g)
1 – 44	0,0942
45 – 50	0,039
51 – 75	0,0792
76 – 117	1.222,5
118 – 131	0,5403
132 – 135	1.428,5
136 – 150	8.581,6
151 – 154	1.336,4
155 – 160	1.581,1
161 – 180	2.372,8
181 – 199	0,2207
200 – 201	0,1165
Total: massa (g) / rendimento (%)	17,6 / 98,6

Fonte: o próprio autor.

6.4.1.15 Tratamento cromatográfico da fração 136 – 150 de FABPC (24 – 25)

A fração **136 – 150** (8,5816 g) obtida do tratamento de **FABPC (24 – 25)** foi submetida a um fracionamento cromatográfico em coluna ($\phi = 6,5$ cm e $L = 10,0$ cm), utilizando 105,0 g de gel de sílica como fase estacionária e os solventes, hexano, acetato de etila e metanol como fase móvel em ordem crescente de polaridade (Tabela 29).

Tabela 29 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de **136 – 150** de **FABPC (24 – 25)**

FRAÇÕES	ELUENTE	VOLUME (mL)
1 – 24	Hexano/Acetato de etila (50:50)	1000
25 – 79	Hexano/Acetato de etila (40:60)	800
80 – 270	Hexano/Acetato de etila (20:80)	600
271	Acetato de etila/Metanol (80:20)	100
272	Metanol	200

Fonte: o próprio autor.

Após análise em CCD das frações coletadas, aquelas que apresentaram o mesmo perfil cromatográfico foram reunidas, obtendo cinco frações, conforme apresentado na Tabela 30.

Tabela 30 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de **FABPC (136 – 150)**

FRAÇÕES REUNIDAS	MASSA (g)
1 – 40	0,0137
41 – 80	0,020
81 – 99	0,1085
100 – 269	5,0196
270 – 272	0,1706
Total: massa (g) / rendimento (%)	5,3324 / 63,2

Fonte: o próprio autor.

6.4.1.16 Extração em fase sólida (EFS) da fração 100 – 269 de FABPC (136 – 150)

Uma porção da fração **100 – 269** (1,0 g) obtida do tratamento da fração **136 – 150**, foi submetida à extração em fase sólida, utilizando cartuchos de fase reversa (Strata C18-E, 20g/60,0 mL, 55 μ m, 70 Å) e como eluentes, água e metanol, obtendo 4 frações com suas respectivas massas, conforme mostrado na Tabela 31.

Tabela 31 – Dados da extração em EFS da fração **100 – 269** de FABPC (136 – 150)

FRAÇÕES	ELUENTE	VOLUME (mL)	Massa (mg)
1	Água/Metanol (75:25)	100	115,0
2	Água/Metanol (50:50)	100	130,7
3	Água/Metanol (25:75)	100	93,5
4	Metanol	200	59,8
Total: massa (mg) / rendimento (%)			399,0 / 39,9

Fonte: o próprio autor.

6.4.1.17 Tratamento cromatográfico da fração 1 de FABPC (100 – 269) e isolamento de BPC-9

A fração **1** (115,0 mg) obtida do tratamento de FABPC (**100 – 269**) foi submetida a um fracionamento em coluna (ϕ = 1,2 cm e L = 25,0 cm), utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionária e metanol como fase móvel, resultando em 26 frações, que foram analisadas por CCD e reunidas em 3 frações de acordo com os perfis cromatográficos (Tabela 32).

Tabela 32 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de FABPC (100 – 269)

FRAÇÕES REUNIDAS	MASSA (mg)
1 – 13	3,8
14 – 20	95,5
21 – 26	7,0
Total: massa (mg) / rendimento (%)	106,3 / 92,4

Fonte: o próprio autor.

A fração **14 – 20** (95,5 mg) precipitou como sólido amorfo avermelhado, solúvel em metanol. Após ser revelada em CCD com solução de vanilina, apresentou uma mancha de cor vermelha escura, sendo denominada de **BPC-9**.

6.4.1.18 Tratamento cromatográfico da fração 3 de **FABPC (100 – 269)**

A fração **3** (93,5 mg) obtida a partir do tratamento de **FABPC (100 – 269)** foi submetida a um fracionamento cromatográfico em coluna ($\phi = 1,5$ cm e $L = 30,0$ cm), utilizando como fase estacionária (Sephadex LH-20) e como fase móvel metanol como fase móvel, obtendo 130 frações. Estas foram analisadas por CCD e reunidas em 8 frações, conforme mostrado na Tabela 33.

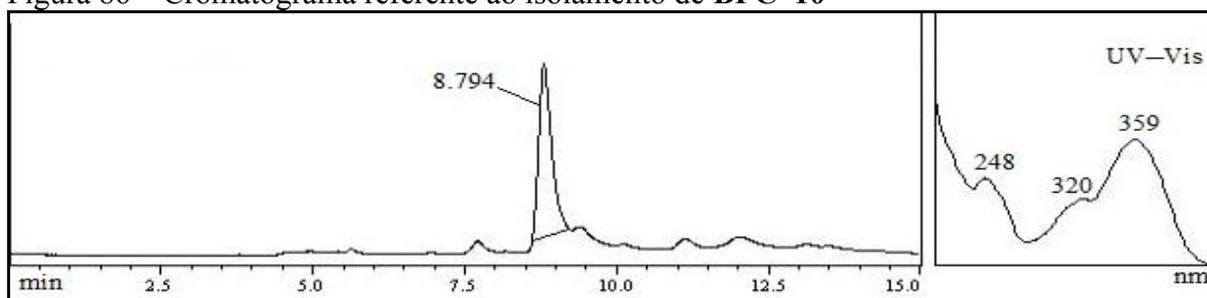
Tabela 33 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de **FABPC (3)**

FRAÇÕES REUNIDAS	MASSA (mg)
1 – 10	2,0
11 – 24	5,2
25 – 44	7,0
45 – 50	3,1
51 – 84	23,1
85 – 94	8,9
95 – 125	40,0
126 – 130	2,0
Total: massa (mg) / rendimento (%)	91,3 / 97,6

Fonte: o próprio autor.

6.4.1.19 Tratamento cromatográfico da fração **95 – 125** de **FABPC (3)** e isolamento de **BPC-10**

A fração **95 – 125** (40,0 mg) oriunda de **FABPC (3)** foi solubilizada no eluente H₂O/ACN (40:60), filtrada e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um sistema com gradiente, iniciando com H₂O/ACN (40:60), seguindo a ACN 90% em 20 minutos e mais 10 minutos de ACN 100% com fluxo de 1,00 mL/min, fornecendo o cromatograma e o espectro na região do UV-Vis, os quais estão apresentados na Figura 86 (pág. 129). Em seguida, foi coletada a amostra referente ao pico com tempo de retenção (t_R) em 8,794 minutos, utilizando uma coluna semipreparativa com fluxo de 3,00 mL/min. A substância de interesse, precipitou na forma de um sólido amorfo amarelo, apresentando uma mancha de cor amarela após ser revelada em CCD utilizando solução de vanilina, sendo denominada de **BPC-10** (11,0 mg).

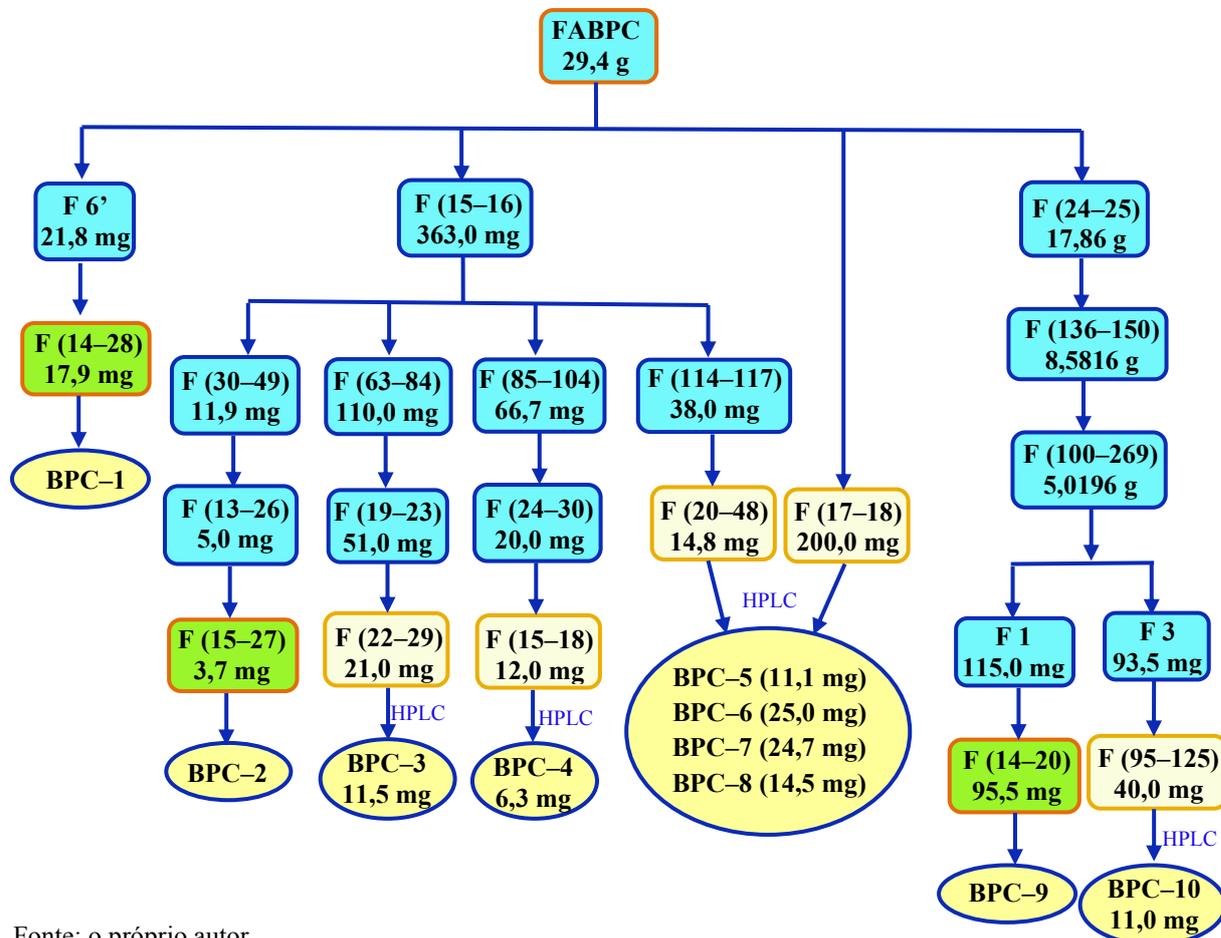
Figura 86 – Cromatograma referente ao isolamento de **BPC-10**

Fonte: o próprio autor.

UV-Vis: Ultravioleta Visível (200 – 400 nm)

O extrato etanólico do caule de *Bauhinia pentandra* (**EEBPC**) foi fracionado, obtendo as frações hexânica (**FHBPC**), diclorometano (**FDBPC**), acetato de etila (**FABPC**), aceto de etila/metanol (1:1) (**FAMBPC**) e metanólica (**FMBPC**). Posteriormente, a fração **FABPC** foi utilizada para o tratamento cromatográfico, resultando no isolamento dos compostos de acordo com o fluxograma abaixo.

Fluxograma 1 – Fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila dos caules de *Bauhinia pentandra* (**EEBPC**)



Fonte: o próprio autor.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo químico do extrato etanólico do caule de *Bauhinia pentandra* (**EECBP**) permitiu o isolamento e a determinação estrutural de onze (11) metabólitos secundários que foram classificados em três classes distintas: uma mistura de esteroides sitosterol e estigmasterol (**BPC-1a** e **BPC-1b**), dois (2) derivados oxepínicos bauhiniastatina 1 (**BPC-2**) e bauhiniastatina 4 (**BPC-3**), sete (7) flavonoides 7,4'-diidroxiflavana (**BPC-4**), (2*S*)-liquiritigenina (**BPC-5**), (2*S*)-naringenina (**BPC-6**), isoliquiritigenina (**BPC-7**), poriol (**BPC-8**), (-)-fisetinidol (**BPC-9**) e fisetina (**BPC-10**). Destaca-se que o poriol (**BPC-8**) está sendo relatado pela primeira vez no gênero *Bauhinia* e com exceção da mistura de esteroides, os demais compostos estão sendo descritos pela primeira vez na espécie *B. pentandra*. Vale ressaltar que presença de flavonoides, esteroides e derivados oxepínicos em espécies de *Bauhinia*, é bastante comum. Portanto, o presente estudo químico da espécie *B. pentandra* está compatível com o perfil quimiotaxonômico do gênero *Bauhinia*.

A atividade inibitória da acetilcolinesterase do extrato etanólico (**EEBPC**) e dos compostos isolados **BPC-2**, **BPC-3**, **BPC-4**, **BPC-5**, **BPC-6**, **BPC-7** e **BPC-10** foi avaliada e com exceção do derivado oxepínico bauhiniastatina 1 (**BPC-2**), os demais compostos e o extrato (**EEBPC**) exibiram atividade, ressaltando que, 7,4'-diidroxiflavana (**BPC-4**) apresentou a melhor atividade, com halo de inibição igual ao da eserina, alcalóide utilizado como controle positivo, enquanto o extrato etanólico (**EEBPC**) foi o menos ativo. Ressalta-se que esse é o primeiro relato sobre a atividade inibitória da acetilcolinesterase do derivado oxepínico bauhiniastatina 4 (**BPC-3**).

(-)-Fisetinidol (**BPC-9**) foi avaliado quanto à atividade antibacteriana sobre cepas de *Staphylococcus aureus* (SA1199-B), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), porém, foi inativo frente às bactérias testadas, com CIM menor que 1024 µg/mL, mas quando combinado com o antibiótico norfloxacino, (-)-fisetinidol (**BPC-9**) exibiu atividade modificadora da ação antibiótica frente a *Staphylococcus aureus* (SA1199-B), teve redução de sua CIM (1/4) em 2 vezes para 32 µg/mL. Quando comparado com a clorpromazina (inibidor clássico), houve reversão da resistência bacteriana.

A investigação química da espécie *B. pentandra* se mostrou satisfatória, se apresentando como uma fonte de substâncias bioativas. Os resultados demonstram que (-)-fisetinidol (**BPC-9**) pode aumentar a eficácia de certos antibióticos, o que significa uma redução substancial da dose de fármaco necessário, e provavelmente, menos efeitos colaterais para pacientes.

REFERÊNCIAS

- ACHENBACH, H.; STOCKER, M.; CONSTENLA, M. A. Flavonoid and other constituents of *Bauhinia manca*. **Phytochemistry**, New York, v. 27, p. 1835–1841, 1988.
- ADEDARA, I. A.; EGO, V. C.; SUBAIR, T. I.; OYEDIRAN, O.; FAROMBI, E. O. Quercetin improves neurobehavioral performance through restoration of brain antioxidant status and acetylcholinesterase activity in manganese-treated rats. **Neurochemical Research**, New York, v. 42, p. 1219–1229, 2017.
- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; DE FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 18, p. 472–508, 2008.
- AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. Elsevier, New York, v. 39, p. 436, 1989.
- AHMADI, A.; HASSANDARVISH, P.; LANI, R.; YADOLLAHI, P.; JOKAR, A.; BAKAR, S. A.; ZANDI, K. Inhibition of chikungunya virus replication by hesperetin and naringenin. **Royal Society of Chemistry**, Cambridge, v. 6, p. 69421–69430, 2016.
- AL-DOSARI, D. I.; AHMED, M. M.; AL-REJAIE, S. S.; ALHOMIDA, A. S.; OLA, M. S. Flavonoid naringenin attenuates oxidative stress, apoptosis and improves neurotrophic effects in the diabetic rat retina. **Nutrients**, Basel, v. 9, p. 1–13, 2017.
- ALI, H.; DIXIT, S.; ALI, D.; ALQAHTANI, S. M.; ALKAHTANI, S.; ALARIFI, S. Isolation and evaluation of anticancer efficacy of stigmasterol in a mouse model of DMBA-induced skin carcinoma. **Drug Design, Development and Therapy**, London, v. 9, p. 2793–2800, 2015.
- ALMEIDA, M. C. S. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas medicinais do Nordeste: *Bauhinia pentandra* (Bong.) D.Dietr. e *Bauhinia monandra* Kurz.** 2015. 258 f. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.
- ALMEIDA, M. C. S.; SOUZA, L. G. S.; FERREIRA, D. A.; PINTO, F. C. L.; DE OLIVEIRA, D. R.; SANTIAGO, G. M. P.; MONTE, F. J. Q.; BRAZ-FILHO, R.; DE LEMOS, T. L. G. 7-epi-griffonilide, a new lactone from *Bauhinia pentandra*: complete ¹H and ¹³C chemical shift assignments. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 89, p. 65–71, 2017.
- ANJANEYULU, A. S. R.; RAGHAVA REDDY, A. V.; REDDY, D. S. K.; WARD, R. S.; ADHIKESAVALU, D.; STANLEY CAMERON, T. Pacharin: a new dibenzo (2,3-6,7) oxepin derivative from *Bauhinia racemosa* Lank. **Tetrahedron**, Oxford, v. 40, p. 4245–4252, 1984.
- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma enzima de interesse farmacológico. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 8, p. 1818–1834, 2016.

ARAÚJO, C. R. R.; SILVA, T. M.; SANTOS, M. G.; OTTONI, M. H. F.; FAGUNDES, E. M. S.; FONTOURA, H. S.; De MELO, G. E. B. A.; ALCÂNTARA, A. F. C. Anti-inflammatory and cytotoxic activities of the extracts, fractions, and chemical constituents isolated from *Luehea ochrophylla* Mart. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v.19, p. 1–10, 2019.

ARAÚJO, R. M.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Pterocarpan and a novel flavanone from *Harpalyce brasiliensis* roots. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, p. 935–938, 2009.

ATHIKOMKULCHAI, S.; SRIUBOLMAS, N.; RUANGRUNGSI, N. Antibacterial activity of flavonoids from *Bauhinia sirindhorniae*. **Journal of Health Research**, Bangkok, v.19, p. 13–18, 2005.

AWALE, S.; MIYAMOTO, T.; LINN, T. Z.; LI, F.; WIN, N. N.; TEZUKA, Y.; ESUMI, H.; KADOTA, S. Cytotoxic constituents of *Soymida febrifuga* from Myanmar. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 72, p. 1631–1636, 2009.

BOONPHONG, S.; PUANGSOMBAT, P.; BARAMEE, A.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; KITTAKOOP, P. Bioactive compounds from *Bauhinia purpurea* possessing antimalarial, antimycobacterial, antifungal, anti-inflammatory and cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 70, p. 795–801, 2007.

BRUNEAU, E.; SUTTER, D.; HUME, R. I.; AKAABOUNE, M. Identification of nicotinic acetylcholine receptor recycling and its role in maintaining receptor density at the neuromuscular junction in vivo. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 25, p. 9949–9959, 2005.

CAKMAK, K. C.; GULÇIN, I. Anticholinergic and antioxidant activities of ursolic acid-an activity-structure insight. **Toxicology Reports**, Ireland, v. 6, p. 1273–1280, 2019.

CARVALHO, J. L. **Estudo químico e biológico de *Bauhinia pulchella* Benth.** 2014. 145 f. Dissertação (Mestrado em Química), Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

CECHINEL FILHO, V. Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*. **Phytotherapy Research**, London, v. 23, p. 1347–1354, 2009.

CECHINEL-ZANCHETT, C. C.; BOEING, T.; SOMENSI, L. B.; STEIMBACH, V. M. B.; CAMPOS, A.; KRUEGER, C. M. A.; SCHULTZ, C.; SANT'ANA, D. M. G. CECHINEL-FILHO, V.; DA SILVA, L. M.; DE ANDRADE, S. F. Flavonoid-rich fraction of *Bauhinia forficata* Link leaves prevents the intestinal toxic effects of irinotecan chemotherapy in IEC-6 cells and in mice. **Phytotherapy Research**, London, v. 33, p. 90–106, 2019.

CHEN, B. H.; PARK, J. H.; AHN, J. H.; CHO, J. H.; KIM, I. H.; LEE, J. C.; WON, M.-H.; LEE, C.-H.; HWANG, I. K.; KIM, J.-D.; KANG, I. J.; CHO, J. H.; SHIN, B. N.; KIM, Y. H.; LEE, Y. L.; PARK, S. M. Pretreated quercetin protects gerbil hippocampal CA1 pyramidal neurons from transient cerebral ischemic injury by increasing the expression of antioxidant enzymes. **Neural Regeneration Research**, Shenyang, v. 12, p. 220–227, 2017.

CHENG, X.; YANG, Y.-L.; YANG, H.; WANG, Y.-H.; DU, G.-H. Kaempferol alleviates LPS-induced neuroinflammation and BBB dysfunction in mice via inhibiting HMGB1 release and down-regulating TLR4/MyD88 pathway. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 56, p. 29–35, 2018.

CHEW, Y. L.; MAHADI, A. M.; WONG, K. M.; GOH, J. K. Anti-methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) compounds from *Bauhinia kockiana* Korth. and their mechanism of antibacterial activity. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v.18, p. 1–9, 2018.

CONCEIÇÃO, D. C. O. **Estudo químico e atividade antifúngica das espécies *Bauhinia cheilantha* (Bong) Steudel e *Bauhinia pentandra* (Bong) Vog. ex. Steua (Fabaceae)**. 2015. 70 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2015.

COSTA, M. P.; BOZINIS, M. C. V.; ANDRADE, W. M.; COSTA, C. R.; DA SILVA, A. L.; DE OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; FERNANDES, O. F. L.; SOUZA, L. K. H.; SILVA, M. R. R. Antifungal and cytotoxicity activities of the fresh xylem sap of *Hymenaea courbaril* L. and its major constituent fisetin. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 14, p. 1–7, 2014.

COSTA, L. M.; DE MACEDO, E. V.; OLIVEIRA, F. A. A.; FERREIRA, J. H. L.; GUTIERREZ, S. J. C.; PELÁEZ, W. J.; LIMA, F. C. A.; DE SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; COUTINHO, H. D. M.; KAATZ, G. W.; DE FREITAS, R. M.; BARRETO, H. M. Inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by synthetic riparins. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 121, p. 1312–1322, 2016.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. **Chemotherapy**, Basel, v. 54, p. 328–330, 2008.

CRISÓSTOMO, C. V. **Polissacarídeo endospérmico de *Bauhinia pentandra*: caracterização e estudo de interação com lectinas**. 2008. 100 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

CUTIGNANO, A.; NUZZO, G.; IANORA, A.; LUONGO, E.; ROMANO, G.; GALLO, C.; SANSONE, C.; APREA, S.; MANCINI, F.; D'ORO, U.; FONTANA, A. Development and application of a novel SPE-method for bioassay-guided fractionation of marine extracts. **Marine Drugs**, Basel, v. 13, p. 5736–5749, 2015.

DE LA TORRE, B. G.; ALBERICIO, F. The pharmaceutical industry in 2018. Analysis of FDA drug approvals from the perspective of molecules. **Molecules**, Basel, v. 24, p. 1–12, 2019.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2ª ed. revista e ampliada, São Paulo: UNESP, 2002.

DUBEY, J. K.; PATYAL, S. K. **Encyclopedia of Pest Management**. D. Pimentel, CRC Press, New York, v. 2, 2007.

- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES JÚNIOR, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v.7, p. 88–95, 1961.
- EVANS, L. M.; COWEY, S. L.; SIEGAL, G. P.; HARDY, R. W. Stearate preferentially induces apoptosis in human breast cancer cells. **Nutrition and Cancer**, London, v. 61, p. 746–753, 2009.
- FARIAS, P. A. M.; FIGUEREDO, F. G.; LUCAS, A. M. B.; DE MOURA, R. B.; COUTINHO, H. D. M.; DA SILVA, T. M. S.; MARTIN, A. L. A. R. FONTELES, M. M. F. Antibiotic-modifying activity of riachin, a non-cyanogenic cyanoglycoside extracted from *Bauhinia pentandra*. **Drug Design, Development and Therapy**, London, v. 9, p. 3067–3072, 2015.
- FERRARI, J.; DE OLIVEIRA, D. M.; ARAGÃO, N. M. Phytochemical constituents isolated from the stem bark of *Bauhinia monandra*. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 26, p. 1–6, 2019.
- FERREIRA, D. T.; ALVARES, P. S. M.; HOUGHTON, P. J.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos das raízes de *Pyrostegia venusta* e considerações sobre a sua importância medicinal. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, p. 42–46, 2000.
- FRABASILE, S.; KOISHI, A. C.; KUCZERA, D.; SILVEIRA, G. F.; VERRI JÚNIOR, W. A.; DOS SANTOS, C. N. D.; BORDIGNON, J. The citrus flavanone naringenin impairs dengue virus replication in human cells. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, p. 1–10, 2017.
- GAD EL-MOULA, A. K. F.; AWAD, A. E.; EL-SAYED, A. I.; EL-SAADANY, S. S. Antibacterial activity of water and ethanolic extracts of *Bauhinia variegata* leaves. **Zagazig Journal of Agricultural Research**, Zagazig, v. 46, p. 1141–1148, 2019.
- GAUR, R.; YADAV, K. S.; VERMA, R. K.; YADAV, N. P.; BHAKUNI, R. S. In vivo anti-diabetic activity of derivatives of isoliquiritigenin and liquiritigenin. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 21, p. 415–422, 2014.
- GAWADE, B.; FAROOQUI, M. Screening of phytochemicals and *in vitro* antidiabetic activity of *Bauhinia racemosa* Lam. leaves. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, [s. l.], v. 11, p. 190–193, 2018.
- GHOFRANI, S.; JOGHATAEI, M.-T.; MOHSENI, S.; BALUCHNEJADMOJARAD, T.; BAGHERI, M.; KHAMSE, S.; ROGHANI, M. Naringenin improves learning and memory in an Alzheimer's disease rat model: Insights into the underlying mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 764, p. 195–201, 2015.
- GIORDANI, R. B.; PAGLIOSA, L. B.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J. A. S.; DUTILH, J. H. A. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). **Química Nova**, São paulo, v. 31, p. 2042–2046, 2008.
- GÓIS, R. W. S.; DE SOUSA, L. M.; DA SILVA, H. C.; DA SILVA, F. E. F.; PIMENTA, A. T. A.; LIMA, M. A. S.; ARRIAGA, A. M. C.; LEMOS, T. L. G.; BRAZ-FILHO, R.; MILITÃO, G. C. G.; DA SILVA, P. B. N.; GONÇALVES, F. J. T.; SANTIAGO, G. M. P.

Chemical constituents from *Bauhinia acuruana* and their cytotoxicity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 27, p. 711–715, 2017.

GOVINDULA, A.; REDDY, M. S.; MANJULA, M.; REDDY, M. S.; NUSRATH; KALYAN, P. *In vivo* antihyperlipidemic activity and preliminary phytochemical screening of *Bauhinia acuminata*. **International Journal of Pharma Sciences and Scientific Research**, [s. l.], v. 5, p. 62–68, 2019.

IINUMA, M.; OHYAMA, M.; TANAKA, T.; MIZUNO, M.; LANG, F. A. Two c-methylated flavonoid glycosides from the roots of *Sophora leachiana*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 54, p. 1144–1146, 1991.

IMAI, T.; INOUE, S.; OHDAIRA, N.; MATSUSHITA, Y.; SUZUKI, R.; SAKURAY, M.; DE JESUS, J. M. H; OZAKI, S. K.; FINGER, Z.; FUKUSHIMA, K. Heartwood extractives from the amazonian trees *Dipteryx odorata*, *Hymenaea courbaril* and *Astronium lecointei* and their antioxidant activities. **Journal of Wood Science**, [s. l.], v. 54, p. 470–475, 2008.

JANG, D. S.; PARK, E. J.; HAWTHORNE, M. E.; VIGO, J. S.; GRAHAM, J. G.; CABIESES, F.; SANTARSIERO, B. D.; MESECAR, A. D.; FONG, H. H. S.; MEHTA, R. G.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Potential cancer chemopreventive constituents of the seeds of *Dipteryx odorata* (Tonka Bean). **Journal of Natural Products**, Washington, v. 66, p. 583–587, 2003.

JIN, L.; ZENG, W.; ZHANG, F.; ZHANG, C.; LIANG, W. Naringenin ameliorates acute inflammation by regulating intracellular cytokine degradation. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 199, p. 3466–3477, 2017.

JOSHI, A. B.; DESAI, R. R.; BHOBE, M. P. Phytochemical investigation of the hexane extract of stem bark of *Bauhinia purpurea* Linn. **Der Pharma Chemica**, [s. l.], v. 5, p. 116–121, 2013.

HARADA, H.; YAMASHITA, U.; KURIHARA, H.; FUKUSHI, E.; KAWABATA, J.; KAMEI, Y. Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substance in a marine red alga. **Anticancer Research**, [s. l.], v. 22, p. 2587–2590, 2002.

KERNTOPF, M. R.; NASCIMENTO, N. R. F.; FONTELES, M. C. *Bauhinia unguolata* Linn. (pata-de-vaca). In: VIANA, G. S. B.; LEAL, L. K. A. M.; VASCONCELOS, S. M. M., (Org.). **Plantas Medicinais da Caatinga: Atividades Biológicas e Potencial Terapêutico**. Fortaleza: Expressão Gráfica e Editora, p. 93–123, 2013.

KHAMSAN, S.; LIAWRUANGRATH, S.; TEERAWUTKULRAG, A.; PYNE, S. G.; GARSON, M. J.; LIAWRUANGRATH, B. The isolation of bioactive flavonoids from *Jacaranda obtusifolia* H. B. K. ssp. *rhombofolia* (G. F. W. Meijer) Gentry. **Acta Pharmaceutica**, Zagreb, v. 62, p. 181–190, 2012.

KIM, Y. W.; ZHAO, R. J.; PARK, S. J.; LEE, J. R.; CHO, I. J.; YANG, C. H.; KIM, S. G.; KIM, S. C. Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF- κ B-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 154, p. 165–173, 2008.

- KLIMASZEWSKA-WIŚNIEWSKA, A.; GRZANKA, D.; CZAJKOWSKA P.; HAŁAS-WIŚNIEWSKA, M.; DURŚLEWICZ, J.; ANTOSIK, P.; GRZANKA, A.; GAGAT, M. Cellular and molecular alterations induced by low-dose fisetin in human chronic myeloid leukemia cells. **International Journal of Oncology**, [s. l.], v. 55, p. 1261–1274, 2019.
- KLIMASZEWSKA-WISNIEWSKA, A.; HALAS-WISNIEWSKA, M.; TADROWSKI, T.; GAGAT, M.; GRZANKA, D.; GRZANKA, A. Paclitaxel and the dietary flavonoid fisetin: a synergistic combination that induces mitotic catastrophe and autophagic cell death in A549 non-small cell lung cancer cells. **Cancer Cell International**, [s. l.], v. 16, p. 1–23, 2016.
- KONG, L. D.; ZHANG, Y.; PAN, X.; TAN, R. X.; CHENG, C. H. K. Inhibition of xanthine oxidase by liquiritigenin and isoliquiritigenin isolated from *Sinofranchetia chinensis*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 57, p. 500–505, 2000.
- KOZLOWSKA, J.; POTANIEC, B.; ZAROWSKA, B.; ANIOL, M. Synthesis and biological activity of novel *o*-alkyl derivatives of naringenin and their oximes. **Molecules**, Basel, v. 22, p. 1–14, 2017.
- LAN, H.; E-JING, K.; YU-MEI, L.; YU, A.; WEN-SHENG, Z.; DA-HUA, S.; REN-XIANG, T. Synthesis and biological activity of flavane derivatives. **Chinese Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 24, p. 401–408, 2006.
- LANDERS, T. F.; COHEN, B.; WITTUM, T. E.; LARSON, E. L. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. **Public Health Reports**, [s. l.], v. 127, p. 4–22, 2012.
- LEAL, A. L. A. B.; BEZERRA, C. F.; ROCHA J. E.; DOS SANTOS, A. T. L.; DA CRUZ, R. P.; CARNEIRO, J. N. P.; SALES, D. L.; DE FREITAS, T. S.; TINTINO, S. R.; ALMEIDA, W. O.; DO AMARAL, W.; DA SILVA, L. E.; FERRIANI, A. P.; MAIA, B. H. L. N. S.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; BARRETO, H. M.; COUTINHO, H. D. M. *Piper cernuum* Vell.: Chemical profile and antimicrobial potential evaluation. **Industrial Crops & Products**, [s. l.], v. 140, p. 1–9, 2019a.
- LEAL, A. L. A. B.; MACHADO, A. J. T.; BEZERRA, C. F.; INÁCIO, C. E. S.; ROCHA, J. E.; SALES, D. L.; DE FREITAS, T. S.; ALMEIDA, W. O.; DO AMARAL, W.; DA SILVA, L. E.; FERRIANI, A. P.; MAIA, B. H. L. N. S.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; BARRETO, H. M.; COUTINHO, H. D. M. Chemical identification and antimicrobial potential of essential oil of *Piper rivinoides* kunth (BETIS-WHITE). **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 131, p. 1–5, 2019b.
- LI, W.; SUN, Y. N.; YAN, X. T.; YANG, S. Y.; KIM, S.; LEE, Y. M.; KOH, Y.-S.; KIM, Y. H. Flavonoids from *Astragalus membranaceus* and their inhibitory effects on LPS-stimulated pro-inflammatory cytokine production in bone marrow-derived dendritic cells. **Archives of Pharmacal Research**, [s. l.], v. 37, p. 186–192, 2014.
- LIANG, J.; HALIPU, Y.; HU, F.; YAKEYA, B.; CHEN, W.; ZHANG, H.; KANG, X. Naringeni protects keratinocytes from oxidative stress injury via inhibition of the NOD2-mediated NF- κ B pathway in *Pemphigus vulgaris*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 92, p. 796–801, 2017.

LIM, W.; PARK, S.; BAZER, F.W.; SONG, G. Naringenin-induced apoptotic cell death in prostate cancer cells is mediated via the PI3K/AKT and MAPK signaling pathways. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 118, p. 1118–1131, 2017.

LIMA, H. C.; DE QUEIROZ, L. P.; MORIM, M. P.; SOUZA, V. C.; DUTRA, V. F.; BORTOLUZZI, R. L. C.; IGANCI, J. R. V.; FORTUNATO, R. H.; VAZ, A. M. S. F.; DE SOUZA, E. R.; FILARDI, F. L. R.; VALLS, J. F. M.; GARCIA, F. C. P.; FERNANDES, J. M.; MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; PEREZ, A. P. F.; MANSANO, V. F.; MIOTTO, S. T. S.; TOZZI, A. M. G. A.; MEIRELES, J. E.; LIMA, L. C. P.; DE OLIVEIRA, M. L. A. A.; FLORES, A. S.; TORKE, B. M.; PINTO, R. B.; LEWIS, G. P.; BARROS, M. J. F.; RIBEIRO, R. D.; RODRIGUES, R. S.; PENNINGTON, T.; KLITGAARD, B. B.; RANDO, J. G.; SCALON, V. R.; CARDOSO, D. B. O. S.; DA COSTA, L. C.; DA SILVA, M. J.; DE MOURA, T. M.; DE BARROS, L. A. V.; DA SILVA, M. C. R.; DE QUEIROZ, R. T.; SARTORI, A. L. B.; CAMARGO, R. A. Fabaceae. In: Forzza, R. C. *et al.* (Org.). **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil**. Rio de Janeiro, v. 2, p. 989–1102, 2010.

LIMA, W. G.; RAMOS-ALVES, M. C.; SOARES, A. C. Dos distúrbios psiquiátricos à antibioticoterapia: Reposicionamento da clorpromazina como agente antibacteriano. **Revista Colombiana de Ciências Químico Farmacêuticas**, [s. l.], v. 48, p. 5–28, 2019.

LINS, A. C. S. **Estudo químico e atividade antioxidante de *Bauhinia pentandra* (Bong.) Vog. ex Steud e avaliação da atividade inibitória da enzima DNA-topoisomerase II- α humana de substâncias naturais e semi-sintéticas**. 2008. 130 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2008.

LIU, W. J. H. **Traditional Herbal Medicine Research Methods: Identification, Analysis, Bioassay, and Pharmaceutical and Clinical Studies**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2011. 448 p.

LÓPEZ, O.; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J. G. **Green Trends in Insect Control**. 1^a ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2011. 374 p.

LPWG. Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. **Taxonomy**, [s. l.], v. 62, p. 217–248, 2013.

MAIA, G. L. A.; FALCÃO-SILVA, V. S.; AQUINO, P. G. V.; DE ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; TAVARES, J. F.; DA SILVA, M. S.; RODRIGUES, L. C.; DE SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; BARBOSA-FILHO, J. M. Flavonoids from *Praxelis clematidea* R.M. King and Robinson modulate bacterial drug resistance. **Molecules**, Basel, v. 16, p. 4828–4835, 2011.

MALIK, K.; AHMAD, M.; BUSSMANN, R. W.; TARIQ, A.; ULLAH, R.; ALQAHTANI, A. S.; SHAHAT, A. A.; RASHID, N.; ZAFAR, M.; SULTANA, S.; SHAH, S. N. Ethnobotany of anti-hypertensive plants used in Northern Pakistan. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 9, p. 1–18, 2018.

MANS, R. A.; WARMUS, B. A.; SMITH, C. C.; MCMAHON, L. L. An acetylcholinesterase inhibitor, eserine, induces long-term depression at CA3-CA1 synapses in the hippocampus of adult rats. **Journal of Neurophysiology**, [s. l.], v. 112, p. 2388–2397, 2014.

- MARSTON, A.; KISSILING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, [s. l.], v.13, p. 51–54, 2002.
- MATOS, F. J. A. **Farmácias Vivas**: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 4ª ed. Fortaleza: UFC, 2002. 267 p.
- MOREIRA, D. Ervas medicinais: elas são boas para... Revista Globo Rural, 2013. Disponível em: <http://revistagloborural.globo.com/Revista/Common/0,,EMI330103-18283,00-ERVAS+MEDICINAIS+ELAS+SAO+BOAS+PARA.html>. Acesso em: 28 dez. 2019.
- MU, L.-H.; LI, J.-B.; YANG, J.-Z.; ZHANG, D.-M. New dibenz[*b, f*]oxepins from *Cercis chinensis* Bunge. **Journal of Asian Natural Products Research**, [s. l.], v. 9, p. 649–653, 2007.
- MUHAMMAD, A.; DAUDA, U.; JIBRIL, S.; SIRAT, H. M. Acetylcholinesterase inhibitory activity of a cyclitol isolated from the leaves of *Bauhinia rufescens*. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, [s. l.], v. 11, p. 431–434, 2018.
- NOBAKHT, M.; GRKOVIC, T.; TRUEMAN, S. J.; WALLACE, H. M.; KATOULI, M.; QUINN, R. J.; BROOKS, P. R. Chemical constituents of kino extract from *Corymbia torelliana*. **Molecules**, Basel, v. 19, p. 17862–17871, 2014.
- NOGUEIRA, A. C. O.; SABINO, C. V. S. Revisão do gênero *Bauhinia* abordando aspectos científicos das espécies *Bauhinia forficata* Link e *Bauhinia variegata* L. de interesse para a indústria farmacêutica. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 7, p. 77–84, 2012.
- PARK, S.-H.; SIM, Y.-B.; HAN, P.-L.; LEE, J.-K.; SUH, H.-W. Antidepressant-like effect of kaempferol and quercetin, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. saboten. **Experimental Neurobiology**, [s. l.], v. 19, p. 30–38, 2010.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. 5ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015.
- PEREIRA, L. B. S.; COSTA-SILVA, R.; FELIX, L. P.; AGRA, M. F. Leaf morphoanatomy of “mororó” (*Bauhinia* and *Schnella*, Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 28, p. 383–392, 2018.
- PETTIT, G. R.; NUMATA, A.; IWAMOTO, C.; USAMI, Y.; YAMADA, T.; OHISHI, H.; CRAGG, G. M. Antineoplastic agents. 551. Isolation and structures of bauhiniastatins 1-4 from *Bauhinia purpurea*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 69, p. 323–327, 2006.
- PINTO, I. R. **Eficácia de um flavonoide (fisetinidol) obtido do caule de *Bauhinia pulchella* e seu derivado semi-sintético (palmitato de fisetinidol) em um ensaio pré-clínico de periodontite em ratas**. 2019. 104 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)–Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2019.
- PIO, I. D. S. L.; LAVOR, A. L.; DAMASCENO, C. M. D.; MENEZES, P. M. N.; SILVA, F. S.; MAIA, G. L. A. Traditional knowledge and uses of medicinal plants by the inhabitants of

the islands of the São Francisco river, Brazil and preliminary analysis of *Rhaphiodon echinus* (Lamiaceae). **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, v. 79, p. 87–99, 2019.

POSRI, P.; SUTHIWONG, J.; TAKOMTHONG, P.; WONGSA, C.; CHUENBAN, C.; BOONYARAT, C.; YENJAI, C. A new flavonoid from the leaves of *Atalantia monophylla* (L.) DC. **Natural Product Research**, Abingdon, v. 33, p. 1115–1121, 2019.

REDDY, V. P. **Organofluorine Compounds in Biology and Medicine**. 1^a ed. Amsterdam: Elsevier, 2015. 314 p.

RENGARAJAN, T.; NANDAKUMAR, N.; RAJENDRAN, P.; HARIBABU, L.; NISHIGAKI, I.; BALASUBRAMANIAN, M. P. D-pinitol promotes apoptosis in MCF-7 cells via induction of p53 and Bax and inhibition of Bcl-2 and NF- κ B. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Bangkok, v. 15, p. 1757–1762, 2014.

RHEE, K.; VAN DE MEENT, M.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 915, p. 217–223, 2001.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 100, p. 80–84, 2005.

RODRIGUES, R. O.; YAOCHITE, J. N. U.; BRAGA, M. A.; DE SOUSA, A. R.; SASAHARA, G. L.; FONSECA, S. G. C.; ARAÚJO, T. D. V.; SANTIAGO, G. M. P.; DE SOUSA, L. M.; DE CARVALHO, J. L.; DO NASCIMENTO, F. B. S. A.; NOBRE JÚNIOR, H. V.; NAGAO-DIAS, A. T. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Bauhinia unguolata* L. (Fabaceae) on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. **Pharmacognosy Journal**, [s. l.], v. 11, p. 37–42, 2019.

SALAZAR, G. J. T.; DE SOUSA, J. P.; LIMA, C. N. F.; LEMOS, I. C. S.; DA SILVA, A. R. P.; DE FREITAS, T. S.; COUTINHO, H. D. M.; DA SILVA, L. E.; DO AMARAL, W.; DESCHAMPS, C. Phytochemical characterization of the *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) essential oil and antibacterial activity evaluation. **Industrial Crops & Products**, [s. l.], v. 122, p. 591–595, 2018.

SAMPAIO, P. S.; SANCHO, L. G.; DO LAGO, R. F. Implementação da nova regulamentação para prescrição e dispensação de antimicrobianos: possibilidades e desafios. **Cadernos Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 26, p. 15–22, 2018.

SANTOS, M.; FORTUNATO, R. H.; SPOTORNO, V. G. Analysis of flavonoid glycosides with potential medicinal properties on *Bauhinia uruguayensis* and *Bauhinia forficata* subspecies *pruinosa*. **Natural Product Research**, Abingdon, v. 33, p. 2574–2578, 2019.

SANTOS, M.; TEIXEIRA, T. R.; SANTOS, F. R. S.; LIMA, W. G.; FERRAZ, A. C.; SILVA, N. L.; LEITE, F. J.; SIQUEIRA, J. M.; LUYTEN, W.; DE CASTRO, A. H. F.; DE MAGALHÃES, J. C.; FERREIRA, J. M. S. *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. leaves-derived extracts as potent anti-dengue serotype 2. **Natural Product Research**, Abingdon, p. 1–6, 2019.

- SHARMA, N.; SHARMA, A.; BHATIA, G.; LANDI, M.; BRESTIC, M.; SINGH, B.; SINGH, J.; KAUR, S.; BHARDWAJ, R. Isolation of phytochemicals from *Bauhinia variegata* L. bark and their *in vitro* antioxidant and cytotoxic potential. **Antioxidants**, [s. l.], v. 8, p. 1–19, 2019.
- SILVA, A. M. A. **Investigação química e biológica de *Bauhinia cheilantha* (BONG.) STEUD.** 2018. 176 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.
- SILVA, F. M. A.; KOOLEN, H. H. F.; BARISON, A.; DE SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Steroids and triterpene from the bark of *Unonopsis guatterioides* R. E. Fr. (Annonaceae). **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Rohini, v. 4, p. 522–523, 2012.
- SILVA, H. T. D. **Potencial de compostos fenólicos como antimicrobianos e/ou moduladores da resistência em *staphylococcus aureus*.** 2015. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2015.
- SILVA, K. L.; CECHINEL FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p. 449–454, 2002.
- SILVA, T. M. S.; LINS, A. C. S.; SARMENTO-FILHA, M. J.; RAMOS, C. S.; AGRA, M. F.; CAMARA, C. A. Riachin, a new cyanoglucoside from *Bauhinia pentandra* and its antioxidant activity. **Chemistry of Natural Compounds**, [s. l.], v. 49, p. 685–690, 2013.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos.** 7ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.
- SOARES, P. K.; SCARMINIO, I. S. Multivariate chromatographic fingerprint preparation and authentication of plant material from the genus *Bauhinia*. **Phytochemistry Analysis**, [s. l.], v. 19, p. 78–85, 2008.
- SOUSA, K. C. **Atividades antioxidante, antimicrobiana, antibiofilme e citotóxica de extratos da macroalga marinha parda *Lobophora variegata* (J. V. Lamouroux).** 2017. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca)–Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.
- SOUSA, L. M.; DE CARVALHO, J. L.; DA SILVA, H. C.; LEMOS, T. L. G.; ARRIAGA, A. M. C.; BRAZ-FILHO, R.; MILITÃO, G. C. G.; SILVA, T. D. S.; RIBEIRO, P. R. V.; SANTIAGO, G. M. P. New Cytotoxic Bibenzyl and Other Constituents from *Bauhinia unguolata* L. (Fabaceae). **Chemistry & Biodiversity**, Zurich, v. 13, p. 1630–1635, 2016.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III.** 3ª ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2012. 768 p.
- SRINIVASAN, R.; NATARAJAN, D.; SHIVAKUMAR, M. S.; NAGAMURUGAN, N. Isolation of fisetin from *Elaeagnus indica* Serv. Bull. (Elaeagnaceae) with antioxidant and antiproliferative activity. **Free Radicals and Antioxidants**, [s. l.], v. 6, p. 145–150, 2016.

SURESH, G.; TIWARI, A. K.; MURTHY, M. R. K.; KUMAR, D. A.; PRASAD, K. R.; RAO, R. R.; ALI, A. Z.; BABU, K. S. New advanced glycation end-products inhibitors from *Dichrostachys cinerea* Wight & Arn. **Journal of Natural Medicines**, [s. l.], v. 66, p. 213–216, 2012.

TANJUNG, M.; SAPUTRI, R. D.; TIAHJANDARIE, T. S. Antioxidant activity of two isomeric benzoxepin derivatives from the stem bark of *Bauhinia aculeata* L. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 6, p. 705–708, 2014.

TASLIMI, P.; CAGLAYAN, C.; GULCIN, I. The impact of some natural phenolic compounds on carbonic anhydrase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and α -glycosidase enzymes: An antidiabetic, anticholinergic, and antiepileptic study. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, [s. l.], v. 31, p. 1–7, 2017.

TESFAHUNEYGN, G.; GEBREEGZIABHER, G. Medicinal plants used in traditional medicine by Ethiopians: A review article. **Journal of Respiratory Medicine and Lung Disease**, [s. l.], v. 4, p. 1–3, 2019.

TINTINO, S. R. **Avaliação da inibição de bombas de efluxos em linhagens de *Staphylococcus aureus* por substâncias sintéticas de origem natural**. 2018. 137 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

TINTINO, S. R.; GUEDES, G. M. M.; CUNHA, F. A. B.; DOS SANTOS, K. K. A.; MATIAS, E. F. F.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; ANDRADE, J. C.; SOUZA, E. S.; FREITAS, M. A.; ALENCAR, L. B. B.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana e moduladora dos extratos etanólico e hexânico de bulbo de *Costus arabicus*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, p. 732–738, 2013.

TINTINO, S. R., OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M.; CAMPINA, F. F.; SILVA, R. L. P.; COSTA, M. S.; MENEZES, I. R. A.; CALIXTO-JÚNIOR, J. T.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P., COUTINHO, H. D. M.; LEAL-BALBINO, T. C.; BALBINO, V. Q. Evaluation of the tannic acid inhibitory effect against the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 97, p. 9–13, 2016.

TOZZI, A. M. G. A.; MELHEM, T. S.; FORERO, E.; FORTUNA-PEREZ, A. P.; WANDERLEY, M. G. L.; MARTINS, S. E.; ROMANINI, R. P.; PIRANI, J. R.; FIUZA DE MELO, M. M. R.; KIRIZAWA, M.; YANO, O.; CORDEIRO, I. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**, São Paulo: Instituto de Botânica, v. 8, p. 22–83, 2016.

UNO, T.; ISOGAI, A.; SUZUKI, A.; SHIRATA, A. Isolation and identification of ethyl 2,4-dihydroxybenzoate and 5,7-dihydroxychromone from the root bark of mulberry tree (*Morus alba* L.) and their biological activity. **Nippon Sanshigaku Zasshi**, Tokyo, v. 50, p. 422–427, 1981.

VAZ, A. M. S. F.; TOZZI, A. M. G. A. Sinopse de *Bauhinia* sect. *Pauletia* (Cav.) DC. (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cercideae) no Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 28, p. 477–491, 2005.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.; FRAGA C. A. M. New anti-alzheimer drugs from biodiversity: The role of the natural acetylcholinesterase inhibitors. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 5, p. 915–926, 2005.

WAGLE, B. R.; UPADHYAY, A.; ARSI, K.; SHRESTHA, S.; VENKITANARAYANAN, K.; DONOGHUE, A. M.; DONOGHUE, D. J. Application of β -resorcylic acid as potential antimicrobial feed additive to reduce *Campylobacter* colonization in broiler chickens. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, p. 1–9, 2017.

WALKER, C. H. **Organophosphorous and carbamate insectides**. Organic pollutants. An ecotoxicological Perspective. 1^a ed. London: Taylor & Francis, 2001, 304 p.

WALLIS, G. W.; REYNOLDS, G. The initiation and spread of *Poria weirii* root rot of Douglas fir. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 43, p. 1–9, 1965.

WANG, J, FANG, X.; GE, L.; CAO, F.; ZHAO, L.; WANG, Z.; XIAO, W: Antitumor, antioxidant and anti-inflammatory activities of kaempferol and its corresponding glycosides and the enzymatic preparation of kaempferol. **Plos One**, San Francisco, v. 13, p. 1–12, 2018.

WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. 2009. **The families of flowering plants**: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Disponível em: <http://delta-intkey.com>. Acesso em: 04 dez. 2019.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO global report on traditional and complementary medicine 2019**. Geneva: World Health Organization. 2019. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/312342>. Acesso em: 28 dez. 2019.

WU, S.; ZHAO, Z.; OKADA, Y.; WATANABE, Y.; TAKAHATA, T.; INOUE, T.; OTSUBO, E.; WANG, J.; LU, Y.; NOMURA, M. Physiological activity of chinese lichen (*Gyrophora esculenta*) component, methyl 2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate and the related compounds. **Asian Journal of Chemistry**, Ghaziabad, v. 26, p. 702–708, 2014.

WU, Z.; WANG, B.; ZHAO, Y.; YANG, X.; LIANG, H. Chalcones from *Bauhinia glauca* subsp. *pernevosa*. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, Beijing, v. 34, p. 1676–1678, 2009.

XIE, Y.; YANG, W.; CHEN, X.; XIAO, J. Inhibition of flavonoids on acetylcholine esterase: binding and structure-activity relationship. **Food & Function**, Cambridge, v. 5, p. 2582–2589, 2014.

XU, J.; ZHAO, Q.; WEI, L.; YANG, Y.; XU, R.; YU, N.; ZHAO, Y. Phytochemical composition and antinociceptive activity of *Bauhinia glauca* subsp. *hupehana* in rats. **Plos One**, San Francisco, v. 10, p. 1–13, 2015.

XUE, J.; ZHANG, X.; CHEN, X.; ZHANG, Y.; LI, Y. Studies on flavans. III. The total synthesis of (\pm)-7,4'-dihydroxy-3'-methoxyflavan, (\pm)-7,3'-dihydroxy-4'-methoxyflavan, and (\pm)-7,4'-dihydroxyflavan. **Synthetic Communications**, New York, v. 33, p. 3527–3536, 2003.

YUENYONGSAWAD, S.; BUNLUEPUECH, K.; WATTANAPIROMSAKUL, C.; TEWTRAKUL, S. Anti-cancer activity of compounds from *Bauhinia strychnifolia* stem.

Journal of Ethnopharmacology, Ireland, v. 150, p. 765–769, 2013.

ZEKRY, S. H.; ABO-ELMATTY, D. M.; ZAYED, R. A.; RADWAN, M. M.; ELSOHLY, M. A.; HASSANEAN, H. A.; AHMED, S. A. Effect of metabolites isolated from *Cuscuta pedicellata* on high fat diet-fed rats. **Medicinal Chemistry Research**, New York, v. 24, p. 1964–1973, 2015.

ZHANG, B.; LAI, Y.; LI, Y.; SHU, N.; WANG, Z.; WANG, Y.; LI, Y.; CHEN, Z. Antineoplastic activity of isoliquiritigenin, a chalcone compound, in androgen-independent human prostate cancer cells linked to G2/M cell cycle arrest and cell apoptosis. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 821, p. 57–67, 2018a.

ZHANG, Y.; YAN, G.; SUN, C.; LI, H.; FU, Y.; XU, W. Apoptosis effects of dihydrokaempferol isolated from *Bauhinia championii* on Synoviocytes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2018, p. 1–10, 2018b.

ZHENG, Q.-A.; ZHANG, Y.-J.; YANG, C.-R. A new meta-homoisoflavane from the fresh stems of *Dracaena cochinchinensis*. **Journal of Asian Natural Products Research**, [s. l.], v. 8, p. 571–577, 2006.

ZHU, J.; TANG, H.; ZHANG, Z.; ZHANG, Y.; QIU, C.; ZHANG, L.; HUANG, P.; LI, F. Kaempferol slows intervertebral disc degeneration by modifying LPS-induced osteogenesis/adipogenesis imbalance and inflammation response in BMSCs. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 43, p. 236–242, 2017.

ZOCOLER, A. M. D.; SANCHES, A. C. C.; ALBRECHT, I.; DE MELLO, J. C. P. Antioxidant capacity of extracts and isolated compounds from *Stryphnodendron obovatum* Benth. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 45, p. 443–452, 2009.